



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID –TLEMCE-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de biologie

Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} HADJIDJ Nesrine ép : MAMI ET M^{elle} GAOUAR Nesrine ép : ALLAL

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER EN science alimentaire

Option : Biologie De La Nutrition

Thème :

**L'impact des différentes concentrations de la vitamine C et
tanins sur l'intégrité de la membrane des érythrocytes**

Soutenu le :23 /07/2019

Devant le Jury:

Présidente: M^{me} BEKHTI SARI F Maitre de conférences université de Tlemcen

Encadreur: M^{me} MOKHTARI N Maitre de conférences université de Tlemcen

Examinatrice: M^{me} LOUKIDI B Professeur, université Tlemcen

2018/2019

Dédicace

Au nom de Dieu le clément. Louange à dieu qui nous aidés durant des années, éclairé et ouvert les portes du savoir.

C'est avec une profonde émotion qu'on dédie ce mémoire :

A mes très chers parents

Que j'aime beaucoup, qui ont veillé sur mon éducation et qui ont sacrifié les meilleurs moments de leur vie pour ma réussite. Jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur d'eux même. Que dieu les gardent et leurs accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !

A mon mari ALLAL Fayssal

Pour ses encouragements, son dévouement, et son appui à toutes mes entreprises.

A mes très chers frères Charaf eddine, Sidi mohamed et Riad

A Ma belle famille

Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

A ma famille maternelle et paternelle

Mon binôme Hadjidj Nesrine

Pour son aide et son dévouement tout au long de ce travail

Ma chère fille Lina Israa

Et enfin à toute mes amies de la promotion Biologie de la Nutrition 2018-2019 pour tous les moments que nous avons partagés ensemble

Gaouar Nesrine

Dédicace

*A l'aide de la grâce du dieu tout puissant que j'ai achevé ce modeste travail
que je dédie ce travail*

a mon mari MAMI Hadi

pour ses encouragements, son soutien et sa patience

A Ma mère de m'avoir encouragée que dieu la protège.

A Toute ma famille, mes frères et a mon cher père

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le
respect que j'ai toujours eu pour vous et a toute la famille HADJIDJ*

A GAOUAR Nesrine

*pour son aide, je n'arriverai jamais à lui rendre ce qu'elle a fait pour moi que
dieu la protège*

Et à tous mes collègues de la promotion 2018/2019 biologie de la nutrition

A Toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail

NESRINE



Remerciement


On remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

On tient à remercier particulièrement :

Mme MOKHTARI N, professeur à la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Un grand merci à notre encadreur et notre professeur pour avoir dirigé ce travail, pour son sérieux et ses efforts afin de nous aider, de nous conseiller et de nous orienter. On lui exprime notre profond respect et nos chaleureux remerciements.

On tient à remercier Mme BEKHTI F, maître de conférences à l'université de Tlemcen, pour son aide précieuse dans la pratique, sa très grande disponibilité, et sa gentillesse ainsi pour l'honneur qu'elle nous fait de faire partie de ce jury et de présider cette soutenance.

Mme Loukidi B, maître de conférences à l'université de Tlemcen, qui nous fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail, ainsi que pour son aide et ses conseils durant nos études.



Liste des abréviations

AG :	Acide gras
AGPI :	Acide gras polyinsaturé
$C_6H_{12}O_6$:	Glucose
CAT :	Catalase
Cu:	Cuivre
DTNB	Acide 5,5-dithiodis-2,6-dinitrobenzoïque
EOA :	Espèces oxygénées réactives
ERO :	L'espèce réactive d'oxygène
ES :	L'erreur standard
GPx :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion
H_2O_2:	Peroxyde d'hydrogène
J :	Joule
LDL:	Low density lipoprotein
LOOH :	Hydro peroxyde
MDA :	Malondialdéhyde
Mn:	Manganèse
NO•:	Monoxyde d'azote
$O_2^{\bullet-}$:	Anion superoxyde
OH:	Groupe hydroxyle
PBS :	Tampon phosphate
RL:	Radical libre
RNS :	Espèce réactive d'azote

ROOH:	Des peroxydes organiques
ROS:	Espèces réactives de l'oxygène
SOD:	Superoxyde dismutase
TBA:	Acide thiobarbeturique
TBHP :	Hydroxyperoxyde de tert-butyle
UV:	Ultraviolet
Zn	Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Photo de fruit *Citrus sinensis*.

Figure 02 : Coupe transversale de fruit de *citrus sinensis*.

figure03 : Photographie de clémentine.

Figure 4: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

Figure05 : Structure de l'acide L-ascorbique.

Figure 06 : Structure chimique des tanins hydrolysables.

Figure 07: Structure chimique des tanins condensés.

Figure 08 : organigramme qui présente le test d'hémolyse.

Figure09 : Effet de différentes concentrations de vitamine C combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

Figure 10 : Effet de différentes concentrations de vitamine C combinées ou non au TBHP sur le GSH.

Figure11 : Effet de différentes concentrations de vitamine C combinées ou non au TBHP sur le MDA.

Figure12 : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

Figure13 : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur le GSH.

Figure14 : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur le MDA.

Figure15 : Effet de différentes combinaisons de vitamine C/tanins combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

Figure 16 : Effet de différentes combinaisons de vitamine C/tanins combinées ou non au TBHP sur le GSH.

Figure 17 : Effet de différentes combinaisons de vitamine C/tanins combinées ou non au TBHP sur le MDA.

Liste des tableaux

Tableau01 : Composition nutritive moyenne de fruit d'orange.

Tableau 02: Description botanique de la clémentine.

Tableau 03. Valeur nutritive de la clémentine.

Tableau 4 : Les bienfaits de la clémentine.

Tableau 05: Les sources exogènes et endogènes du stress oxydant.

Tableau 06 : Propriétés chimiques et physiques de l'acide ascorbique.

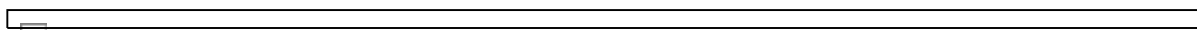
Tableau 07 : Quelques sources naturelles de la vitamine C

Sommaire

➤ Dédicace	
➤ Remerciements	
➤ Les abréviations	
➤ Liste des figures	
➤ Liste des tableaux	
➤ Introduction.....	01

Partie -I- Revus bibliographique

I.L'orange.....	03
I.1 origine et histoire de l'orange.....	03
I.2 définition de l'orange.....	04
I-3 Description morphologique d'orange	04
I-4 Composition chimique et Valeurs nutritive de l'orange.....	06
I-5 L'importance économique de l'orange	06
I.6. La Clémentine	07
I.6.1. origines et histoire de la clémentine	07
I.6.2 Définition de la clémentine	07
I.6.3 Desdescription botanique de la clémentine	07
I.6.4 Les différentes variétés de la clémentine.....	09
I.6.5 Valeur nutritive de la clémentine	10
I.6.6 Les bienfaits de la clémentine	11
II. le stress oxydant	12
II.1 Les différentes sources du stress oxydant	12
II.2. Les types des radicaux libres	13
II.2.1 L'espece reactive d'oxygene (ERO)	13
II.2.2 L'espece reactive d'azote (RNS).....	13



II.3 Effet toxique des radicaux libres sur les biomolécules	13
II.3.1 L'ADN	13
II.3.2 Les lipides	14
II.3.3 Les glucides.....	15
II.3.4 Les protéines.....	15
II.4 Effet bénéfique des radicaux libres (RL)	15
II.5 Les antioxydants	15
II.5.1 Les antioxydants enzymatiques (endogènes).....	16
II.5.1.1 Catalase (CAT).....	16
II.5.1.2 Glutathion peroxydase (GPX), et Glutathion réductase	16
II.5.1.3 Superoxyde dismutase (SOD).....	16
II.5.2 Antioxydants non enzymatiques.....	16
II.5.2.1 Le Glutathion (GSH).....	16
II.5.2.2 Vitamine E.....	17
II.5.2.3 Caroténoïdes.....	17
II.5.2.4 Flavonoïdes.....	17
II.5.2.5 Poly phénols.....	18
II.5.2.6 Le Coenzyme Q10 et cytochrome C.....	18
II.5.2.7 L'acide ascorbique (vitamine C)	18
II.5.2.8 Les tanins	19
III. L'acide ascorbique et les Tanins	20
III.1 L'acide ascorbique.....	20
III.1.1 Généralités	20
III.1.2 Structure.....	20
III.1.3 Propriétés physico-chimiques.....	21
III.1.4 Sources de L'acide ascorbique.....	21
III.1.5 Rôles biologiques de l'acide ascorbique.....	22
III.1.6 Synergie thérapeutique de la vitamine C.....	24

III.2 Les tanins	24
III.2.1 Les tanins hydrolysables.....	24
III.2.2 Les tanins condensés	25
III.2.3 Rôles	27
III.2.4 Propriétés antioxydants des tannins	27

Partie - II- Matériels et méthodes

I. Protocole expérimental.....	28
I.1 Matériel végétal	28
I.2 Préparation des extraits des peaux sèche de clémentine	28
I.3 Extraction sélective des tanins	28
I.4 Préparation des dilutions de la vitamine C et de tanins.....	29
II. Test d'hémolyse	29
II.1 Taux d'hémolyse	32
II.2 Hémolyse Totale.....	32
II.2.1 Dosage des glutathion GSH.....	32
II.2.2 Dosage du malondialdehyde (MDA).....	33
III. Etude statistique.....	33

Partie - III- Résultats et interprétation

I. Statut oxydant/antioxydant	34
I.1. L'acide ascorbique.....	34
I.1.1Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence de l'acide ascorbique.....	34
I.1.2 Teneurs érythrocytaires de GSH en présence de l'acide ascorbique.....	34
I.1.3 teneurs érythrocytaires de MDA en présence de l'acide ascorbique.....	34
I.2 Tanins	37
I.2.1 Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des tanins.....	37
I.2.2 Teneurs érythrocytaires de GSH en présence des tanins.....	37

I.2.3 teneurs érythrocytaires de MDA en présence des tanins.....	37
I.3 Acide ascorbique combiné aux tanins	40
I.3.1 Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence d'acide ascorbique combiné aux tanins.....	40
I.3.2 Teneurs érythrocytaires de GSH en présence d'acide ascorbique/tanins.....	40
I.3.3 teneurs érythrocytaires de MDA en présence d'acide ascorbique/tanins.....	40
➤ Discussion.....	43
➤ Conclusion.....	46
➤ Les références	
➤ Le résumé	

Introduction

Le régime méditerranéen repose principalement sur la consommation élevée de fruits et légumes assurant une protection de l'organisme contre plusieurs agressions endogènes et exogènes responsables de diverses pathologies (**Tomas-Barberan et Gil, 2008**).

Selon l'OMS, d'après des statistiques en 2008, plus de 80% de la population mondiale se retourne à la médecine traditionnelle pour leurs premiers soins (**Pierangeli et al, 2009**).

De nos jours, les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde. La production mondiale des agrumes se situe autour de 66,4 millions de tonnes en 2010 avec une augmentation de 14 pour cent par rapport à celle enregistrée durant la période 1997- 1999. Sur le total de la production d'agrumes, près de 60 pour cent sont consommés sur le marché du frais, et approximativement 40 pour cent sont transformés (**Loeillet, 2010**). L'Algérie possède 55,000 ha de superficies productives d'agrumes dont 56 % se situent au centre du pays (**Houaoura 2013**).

Parmi tous les agrumes, l'orange occupe une place importante dans l'alimentation humaine, elle est généralement disponible de l'hiver à l'été avec des variations saisonnières en fonction de la variété ce qui fait d'elle le fruit le plus populaire (**Virbel, 2011**).

L'endocarpe est la partie comestible de l'orange et son écorce est son déchet. Riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine c, composés phénoliques) ce qui peut faire de l'orange un gisement à valoriser (**Tian et al., 2001 ; Singh et al., 2010**). Les composés phénoliques de l'orange sont d'un intérêt scientifique de part leurs activités antioxydantes naturells (**Ramphul et al., 2010**). Les antioxydants permettent de ralentir le phénomène d'oxydation, ils empêchent le vieillissement cellulaire en interrompant la propagation du stress oxydatif, interceptant ainsi le message de l'apoptose (mort cellulaire programmé) (**Macheix, 2005**).

Les tanins sont l'un des composés poly phénoliques, répondues dans le règne végétal en particulier chez les plantes supérieures où ils se retrouvent dans les racines, les feuilles, les fleurs et les fruits (**Sakakibara et al., 2003**).

Leurs activité antioxydante se produit par l'inhibition de la lipopéroxydation : diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes de citrus limon et la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines de faible densité LDL dans le sang (**Gonzalez-Molina et al., 2010**).

La vitamine C est un puissant antioxydant qui est le plus abondant dans nos régimes alimentaires (**Gallarate M et al., 1999**). L'acide ascorbique joue un rôle important dans les cellules épithéliales comme agent protecteur contre le stress oxydant et stimule le processus de cicatrisation, et protège les structures intracellulaires du stress oxydant, et aussi capable de déclencher la différenciation cellulaire, améliorant ainsi l'aspect et la rigidité de la peau, et de lutter contre le stress oxydant via l'augmentation du taux antioxydant au sein des cellules. (**Manela-Azulay et al., 2009**).

Une des variétés de l'orange, la clémentine née en Algérie autour de 1920 et issu du croisement d'un mandarinier avec une orange douce (**louis, 1926**).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une valorisation des tanins de l'écorce de la clémentine et de la vitamine C.

Le but de ce travail est d'étudier l'impact de différentes concentrations de la vitamine C et des tanins ainsi que leurs combinaisons sur le stress oxydant. L'effet antioxydant des tanins de l'écorce de la clémentine et de la vitamine C est mis en évidence *in vitro* par plusieurs méthodes : d'abord par l'action de ces deux antioxydants sur les érythrocytes et mise en évidence par le test d'hémolyse. Ensuite le dosage des teneurs érythrocytaire en MDA, marqueur de peroxydation lipidique et le GSH, un antioxydant permet de mettre en évidence l'action séparée et conjointe des tanins de la clémentine et de la vitamine C sur les modifications de ces deux paramètres du stress oxydatif.

Revus bibligrafique

I.L'orange

I.1. origine et histoire de l'orange

Le terme « orange » pour désigner le fruit, est apparu au XIII^e siècle. Il vient de l'arabe narandj, dont le sens est « fruit aimé des éléphants ». Le « o » a été accolé au nom arabe par influence du nom de la ville d'Orange (**Mitterrand et al., 1971**). L'oranger (*Citrus sinensis*) est originaire de Chine (**figure 1**). Il est cultivé en Asie depuis plus de 4000 ans .On peut distinguer deux grandes routes de pénétration de ce fruit en Europe. La route méditerranéenne fut empruntée, à l'époque des croisades (XI^e siècle-XIII^e siècle), par l'orange amère ou *bigarade* transmis par les Perses aux Arabes, ce fruit fut implanté en Andalousie, Sicile et pays Valencia, d'où il se diffusa vers le reste de l'Europe. A la fin du XV^e siècle, les navigateurs portugais découvrirent l'orange douce en Chine, et la rapportèrent en Europe. Par sa douceur, elle évince très vite l'orange amère. Aujourd'hui, l'oranger est l'arbre fruitier le plus cultivé dans le monde (**Liu et al., 2012**).



Figure 1 : Photo de fruit *Citrus sinensis*

(Fiche réalisée par le Centre Municipal de Pomologie © 30100 Ales.)

I.2. Définition de l'orange

L'orange fait partie de la famille des agrumes. Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence (Loussert et al., 1989).

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orangé sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou flavedo ou encore zeste en cuisine. La couche interne, blanche et spongieuse, est le mésocarpe ou albédo (Bénédicte et al., 2011)

I-3 Description morphologique d'orange :

A l'état naturel, on retrouve l'huile essentielle dans l'écorce des oranges frais, séparée de la pulpe par l'albédo (membrane blanche que l'on retrouve dans tous les agrumes). On trouve le jus dans la pulpe (Polese et al., 2008). Les différentes parties de l'orange sont représenté ci dessous :

L'épiderme : composé de cires épicuticulaires en forme de plaques. La quantité de cires dépend de la variété, des conditions climatiques et de la croissance.

Le Flavédo : caractérisé par sa couleur jaune, verte ou orange. Il abrite les vésicules oléifères qui sont caractérisées par des parois très fines et fragiles qui renferment l'huile essentielle.

L'Albédo : fait de cellules à structures tubulaires qui forment une véritable toile avec la plupart du volume tissulaire comprimé dans l'espace intercellulaire. L'épaisseur de l'albédo varie selon le type d'agrumes et le type de cultures. Il est très riche en flavonoïdes, responsable de l'amertume du jus.

La pulpe est formée de :

L'endocarpe : des fruits avec les carpelles dans lesquelles se trouvent les vésicules contenant le jus, qui, d'un point de vue biosynthétique devrait être considéré comme le liquide relâché par le cytoplasme et par les vacuoles des cellules internes des vésicules (10 à 14 sections).

La Navalisation : correspond à la formation d'un autre petit fruit plus ou moins avorté, soit à l'intérieur soit repoussé l'extérieur, formant une protubérance comme on le rencontre chez l'orange nave (Ramful et al., 2010) (Figure 2).

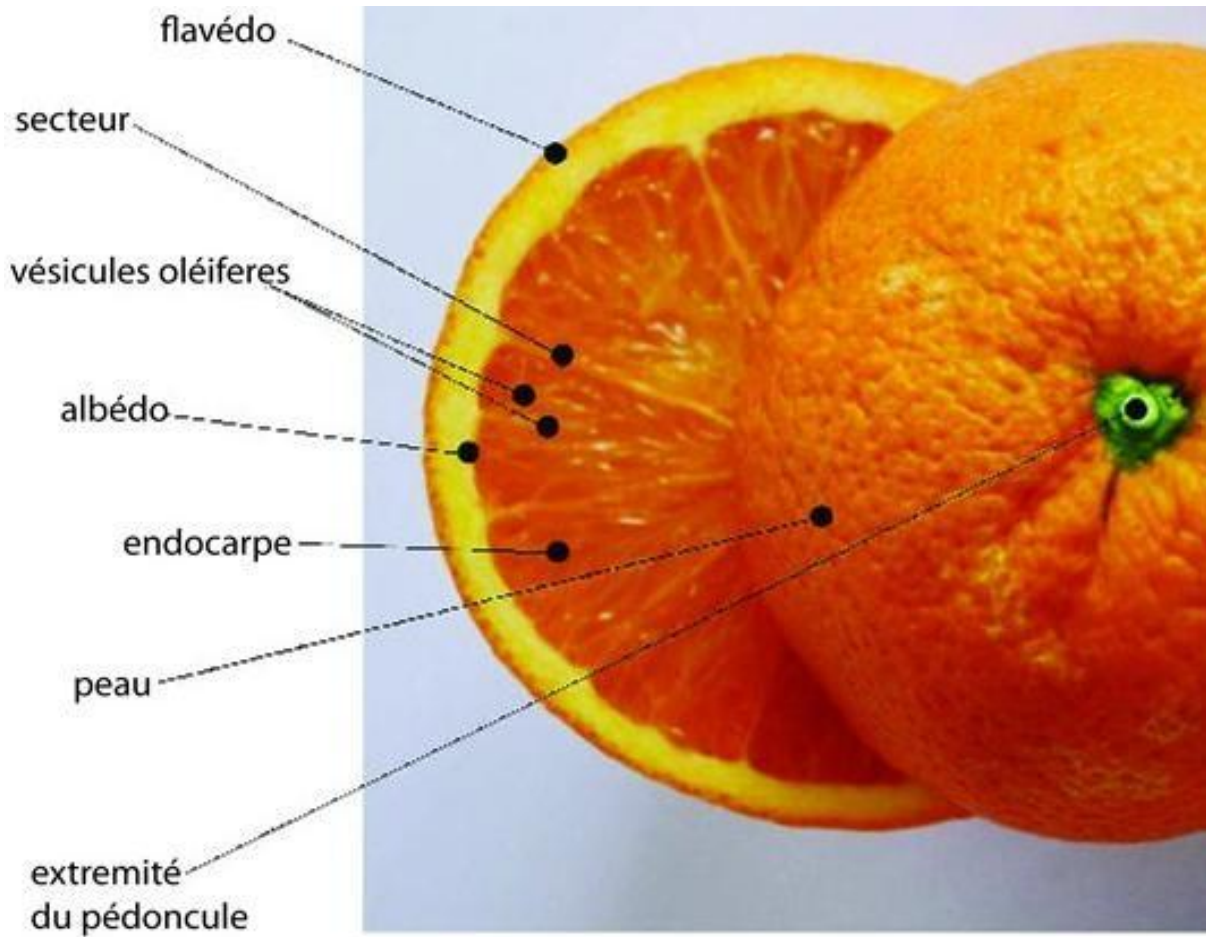


Figure 02 : Coupe transversale de fruit de *Citrus sinensis* (Polese, 2008).

I-4 Composition chimique et Valeurs nutritive de l'orange :

L'orange contient de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C, vitamines P, B₁, B₉, E, provitamine A. Riche en calcium, riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion (**Bousbia, 2011**).

Les principaux composés de l'orange sont résumés dans le (Tableau 02)

Tableau01 : Composition nutritive moyenne de fruit d'orange. (**Santé Canada, 2008**).

Composition	Valeur nutritive
Energie (Kcal)	62
Protéines (g)	1
Glucides (g)	15
Sucres totaux (g)	12
Fibres alimentaires totaux (g)	23
Potassium (mg)	237
Gras totaux (g)	Traces
Beta-carotène (mg)	93
Vitamine C (mg)	70
Calcium (mg)	52

I-5 L'importance économique de l'orange :

Les oranges occupent la majeure partie du marché en raison de leur utilisation en tant que fruits frais mais également employés dans la transformation alimentaire industrielle et cosmétique (jus parfum et huiles essentielles...). La production des oranges en Algérie est très importante de l'ordre de 890 674 tonnes en 2013. A l'échelle mondiale, le premier pays producteur est le Brésil avec environ 17 549 536 tonnes en 2013 d'oranges suivi des Etats-Unis en 2015 avec environ 7 574 094 tonnes produites. Ces deux pays sont les principaux expéditeurs d'orange (**FAO, 2016**).

I.6. La Clémentine :

I.6.1. origines et histoire de la clémentine :

Le père Clément vivait en Algérie, à Misserghin, au début du XX^e siècle, où il s'occupait d'un orphelinat agricole, et notamment des plantations. Intéressé, voire passionné, par l'arboriculture, il entretenait et développaient vignes et vergers. Il a largement contribué à la prospérité des vingt hectares de pépinière de l'orphelinat, et sans doute davantage, en introduisant en Algérie plusieurs centaines d'espèces d'arbres. On dénombre que le Frère a développé jusqu'à 10.000 plants d'arbres et 600 espèces de rosiers, sans oublier les nombreuses greffes heureuses.

Ces résultats remarquables firent de lui une encyclopédie botanique vivante, savoir acquis au cours de ses expérimentations car sans aucune formation.

L'histoire raconte que le père Clément, avec l'aide du botaniste Charles Trabut, aurait procédé à une greffe de mandarinier avec une variété de bigaradier **orange amère** à feuilles de saule, le Granito qui donna naissance à ce nouvel agrume baptisé "clémentine" (Louis, 1926).

I.6.2 Définition de la clémentine :

La clémentine (*Citrus clementina*) est un agrume, appartenant à la famille des rutacées.

Et classe (magnoliopsida) et d'ordre (spindales).

la clémentine est un hybride d'orange amère et de mandarine Très apprécié pour ces qualités gustatives associé à la quasi-absence des pépins (Figure 3).

I.6.3 Description botanique de la clémentine :

La clémentine (*citrus clementina*) est un agrume appartenant a la famille des rutacées et classe (magnoliopsida) et d'ordre (spindales). (Le tableau 02) établit ci-dessous présente les principaux caractères botaniques de la clémentine.

Tableau 02: Description botanique de la clémentine (Trabut, 1926)

Nom latin	Citrus clémentina ou Citrus réticulata
Famille	Rutacées
Origine	Croisement entre un mandarinier et un bigaradier
Couleur des fleurs	Blanc
Type de plante	Arbre fruitier, agrume
Type de végétation	Vivace
Type de feuillage	Plus ample et plus foncé persistant
Période de floraison	De mars à juillet
Hauteur	8 m en pleine terre



figure03 : Photographie de clémentine (jardinage.ooreka.fr)

I.6.4 Les différentes variétés de la clémentine :

Il ya plusieurs variétés de la clémentine :

-Clémentine Caffin (*Citrus clementina*)

Cette variété provient d'une sélection de clémentine commune découverte au Maroc par Caffinen 1968. Bekri est un nom commercial désignant un ensemble de variétés de clémentines précoces. Arbre de forme sphérique, avec un port étalé et une frondaison dense. La variété Caffin est caractérisée par ses feuilles d'un vert foncé, petites et lancéolées, ainsi que par ses rameaux nombreux et fins à entrenœuds courts.

La vigueur est faible surtout les premières années. Floraison précoce, et la productivité faible lors des premières années mais une bonne production à partir 10ème année au champ. La récolte est en mi-October à la fin Novembre (**Jacquemond et al., 2009**).

-Clémentine commune

Originaire de Chine ou résultat d'une hybridation du père Clément obtenue en Algérie (d'où le nom). Son fruit est proche de celui de la mandarine, essentiellement cultivé sur le pourtour occidental de la Méditerranée, il nous offre ses fruits juteux de septembre à mars.

L'arbre est de forme sphérique, présente un port dressé et une frondaison dense, de forte vigueur. La floraison est précoce, et leur productivité varie de moyenne à forte production (**Benedict et al., 2002**).

-Clémentine Ragheb

Leur origine provient d'une sélection de Clémentine commune découverte à la fin des années 50 par Kuneyl en Algérie dans la région d'Annaba. Ragheb signifie « précoce ».

Arbre de forme ellipsoïdale, elle présente un port dressé et une frondaison dense, elle a une forte vigueur, la floraison est précoce, l'entrée en production lente avec une faible productivité, la récolte s'effectue en mi-octobre à mi-novembre (**Jacquemond et al., 2009**).

I.6.5 Valeur nutritive de la clémentine (tableau03) :

La valeur nutritive de la clémentine est présentée selon le tableau 03 établi ci-dessous

Tableau 03. Valeur nutritive de la clémentine (Louis, 1926)

Clémentine (valeur nutritive 100g)	
Fibres (valeur énergétique 46kcal)	1.4g
Glucides	10.4g
Lipides	0.2g
Vitamine C	41mg
Calcium	26mg
Fer	0.35mg
Magnésium	11mg

I.6.6 Les bienfaits de la clémentine :

La clémentine possède plusieurs bienfaits résumés dans le (tableau 04)

Tableau 4 : Les bienfaits de la clémentine (Sagee et al., 1996)

Aide du système immunitaire	Deux clémentines représentent la moitié de l'apport journalier conseillé en <u>vitamine C</u> bon stimulant du système immunitaire.
Protection du réseau vasculaire	<u>Les flavonoïdes</u> présents dans les clémentines permettent de prévenir les risques de maladies cardio-vasculaires en équilibrant le bilan lipidique.
Santé des os	La clémentine est l'allié de nos os : <u>les caroténoïdes</u> qu'elle contient en quantité non-négligeable les protègent et les renforcent.
Préserve la vue	<u>La vitamine A</u> que contient la clémentine est un rempart contre la dégradation des fonctions visuelles.
Anti vieillissement de la peau	La clémentine est riche en <u>vitamine E</u> , antioxydant puissant qui permet notamment de régénérer les cellules de la peau. La vitamine E est aussi utilisée pour soulager les douleurs menstruelles.
Prévention des maladies cardiovasculaires	<u>La vitamine B</u> présente dans la clémentine protège l'organisme contre les troubles cardiaques
Anti-crampes	<u>Le potassium</u> est l'élément minéral qui est présent en plus grande quantité dans la clémentine. Il a une action positive sur les crampes et sur l'arthrose

II. le stress oxydant :

Le stress oxydant est classiquement défini comme l'altération de la balance oxydants/antioxydants en faveur des oxydants (**Roberts et al., 2000**). En d'autres termes, le stress oxydant se caractérise par un déséquilibre entre la production des radicaux libres (RL) et les capacités anti oxydantes de l'organisme.

Un radical libre est un atome ou molécule ayant un ou plusieurs électrons non appariés sur une orbitale. Cette absence d'appariement lui confère une grande réactivité et donc une durée de vie très courte de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-6} secondes.

En effet, un radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable: il va donc se réduire en oxydant un autre composé (lipides, protéines, ADN...) (**Halliwell, 1996**).

II.1 Les différentes sources du stress oxydant :

Tableau 05: Les sources exogènes et endogènes du stress oxydant (**Haleng et al., 2007**)

Mode de vie	Tabagisme ; faible consommation de fruits et légumes ; Alcool ; Médicaments ; Pilules contraceptives ; exposition au soleil ; Exercice intense ou malade
Environnement	Pollution ; Ozone ; amiante ; radiations ; Contacte avec substances cancérigènes
Mécanismes Biochimiques	Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) Inflammation ; altération de la fonction endothéliale ; surcharge en Fer Oxydation de l'hémoglobine ; altérations Mitochondriales ; biosynthèse des prostaglandines ; interventions chirurgicales

II.2. Les types des radicaux libres :

On distingue deux types des radicaux libres:

II.2.1 L'espece reactive d'oxygene (ERO):

Le terme ROS réfère aux espèces oxygénées qu'elles soient radicalaires tels l'anion super oxyde ($O_2 \cdot^-$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) ou non radicalaires tel le super oxyde d'hydrogène (H_2O_2). La génération des ROS est liée au fonctionnement normal de la cellule. Cependant, elle est amplifiée dans certaines conditions pathologiques telles l'inflammation et l'ischémie/réperfusion, qui peuvent évoluer vers de multiples maladies (**Fuji et al., 2003; Mates, 2000**)

II.2.2 L'espece reactive d'azote (RNS):

Les espèces réactives de l'azote proviennent de la réaction des ROS avec le monoxyde d'azote $NO\cdot$. Ces réactions sont catalysées par la NO synthase dont il existe 3 types : neuronale, endothéliale ou inductible. Dans des conditions physiologiques, l'oxyde d'azote est faiblement réactif. C'est l'action de l'anion super oxyde sur l'oxyde d'azote qui entraîne la formation de réactifs ayant une réactivité élevée. (**Roncon et al., 2005**).



II.3 Effet toxique des radicaux libres sur les biomolécules :

II.3.1 L'ADN

Les ERO, en particulier les radicaux hydroxyles, sont capables de lyser et de modifier des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. . Parmi les bases transformées, la 8-hydroxy-guanine (**marqueur de stress**). De graves altérations du matériel génétique sont induites par cette agression comme: mutations carcinogènes, cassures et anomalies des réparations ce qui peut conduire à l'apoptose (**Favier, 2003**). Le déséquilibre dans la balance oxydants/antioxydants contribue au développement des cancers par différents mécanismes: Modulation des gènes d'expressions, Induction des altérations génétiques (**Valko et al., 2004**).

II.3.2 Les lipides

La peroxydation lipidique est un mécanisme en chaîne de dégradation des AGPI conduisant à la formation d'hydro peroxydes (ROOH) instables, responsables: de la diminution de la fluidité membranaire, dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissus âgés, et genèse de dérivés carcinogènes et pathologies. Quand les lipides sont attaqués par ces espèces réagissant avec l'oxygène (Figure 4), un radical diène conjugué est formé qui en présence d'oxygène va être oxydé en radical peroxy. Ce dernier va à son tour attaquer un AG voisin et se transforme en hydro peroxyde, conduisant à une réaction en chaîne. Les hydro peroxydes non réduits vont se décomposer facilement en différents produits, les plus étudiés sont les aldéhydes : malondialdéhyde (MDA), l'hydroxynonenal et les isoprostanes nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

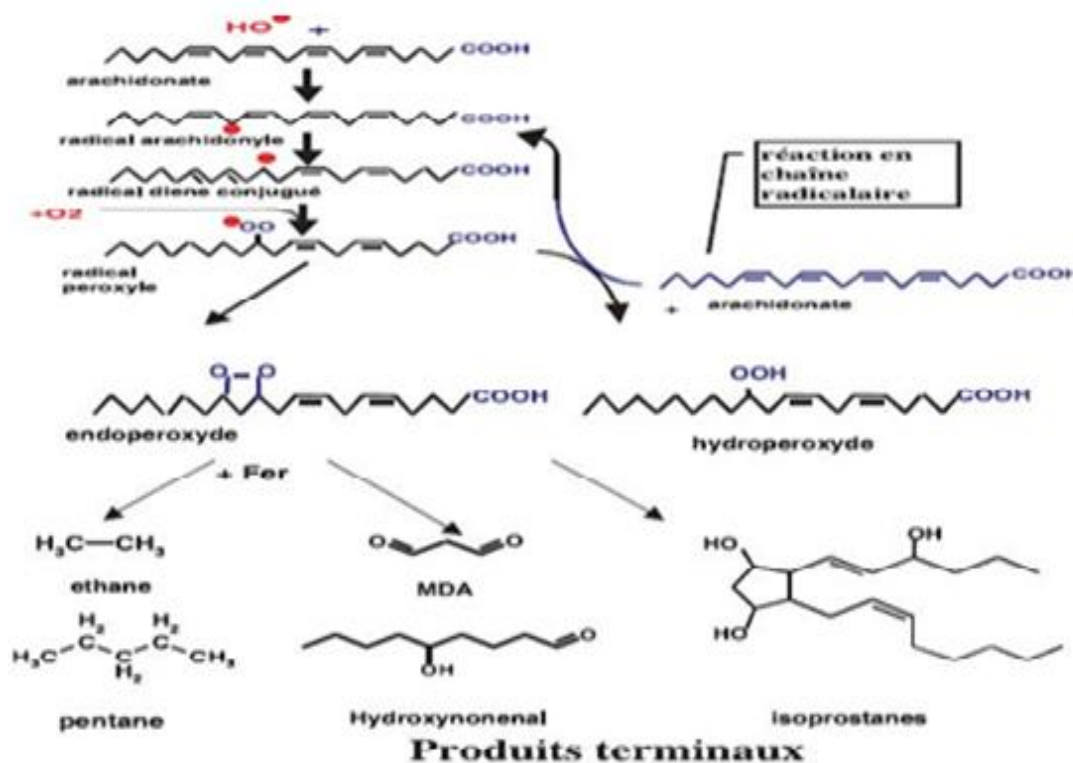


Figure 4: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

II.3.3 Les glucides

Les ROS attaquent les mucopolysaccharides particulièrement les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans les conditions physiologiques en présence des traces d'ions métalliques libérant le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et le céto-aldéhyde, entraînant l'hydrolyse des protéines ou leur glycation (**Favier, 2003**).

II.3.4 Les protéines

Les protéines sont très sensibles à l'attaque du radical hydroxyle (HO•) qui peut dénaturer les sites actifs des protéines enzymatiques. Les ROS sont à l'origine des changements fonctionnels, des fragmentations et une augmentation des attaques protéolytiques des protéines (**Gardes et al., 2003**).

L'accumulation des protéines oxydées peut être à l'origine de nombreuses maladies telles que la maladie d'Alzheimer et la dystrophie musculaire.

II.4 Effet bénéfique des radicaux libres (RL)

Les R.L de l'oxygène ou de l'azote ne sont pas uniquement toxiques. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles (**Valko et al., 2004**) :

- La transduction de signaux cellulaire.
- La différenciation cellulaire.
- La défense immunitaire contre les agents pathogènes.
- La destruction par apoptose des cellules tumorales.
- Le fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, etc.

II.5 Les antioxydants :

Un antioxydant est une substance qui retarde ou empêche l'oxydation d'un substrat oxydable : protéines, hydrates de carbonnes, acides gras (**Dekkers et al., 1996**).

On regroupe les antioxydants en 2 groupes, antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

II.5.1 Les antioxydants enzymatiques (endogènes)

II.5.1.1 Catalase (CAT)

Ces enzymes sont formées de quatre chaînes polypeptidiques comportant chacune un groupement hème qui constitue le site catalytique de catalase (Fer Fe). Elles sont essentiellement présentes dans les peroxysomes et dans les érythrocytes elles sont capables de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

(Goudable et al., 2000).

II.5.1.2 Glutathion peroxydase (GPX), et Glutathion réductase :

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau.

(Haleng et al. 2007)

II.5.1.3 Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD assure l'élimination de l'anion super oxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elle assure ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. La SOD a besoin d'oligo-éléments comme le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD présente dans le cytosol) ou le manganèse (MnSOD présente dans la mitochondrie) pour fonctionner correctement. La SOD existe aussi dans le milieu extracellulaire (Fridovich, 1995).

II.5.2 Antioxydants non enzymatiques

II.5.2.1 Le Glutathion (GSH)

C'est une protéine que nous produisant naturellement et qui est composé de trois acides aminés (systéine, acide glutamique, et glycine). Sous sa forme réduit (GSH) ; réagi comme un antioxydant : assure le maintien de thiols des protéines, ainsi que la forme réduite des vitamines C et E en réduisant la peroxydation des lipides. De plus il piège le peroxyde d'hydrogène, réagi avec l'oxygène singulet et le radicale pyroxyde.

De nombreuses maladies ont maintenant été associées à une déficience en glutathion

Telle que l'alzheimer, le cancer, les maladies cardiaques, le diabète et la dégénérescence musculaire. (Flora et al., 2008)

II.5.2.2 Vitamine E

La vitamine E est l'antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration molaire cellulaire. On ne dénombre pas moins de huit formes de vitamine E dont la plus active est l'alpha-tocophérol (**Meydani, 1995**). Elle permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire et au sein du cholestérol (LDL) (**Meydani et al., 1993**). Elle agit en neutralisant les radicaux libres, devenant elle-même un radical non toxique selon la réaction :



Le tocophérol porteur d'un radical peut réagir avec un nouveau radical libre pour former une espèce neutre, ou être régénéré par la vitamine C.

II.5.2.3 Caroténoïdes

Ils sont majoritairement représentés par la β -carotène, appelée aussi « pro-vitamine A ».

La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singlet et ainsi empêchent l'oxydation de plusieurs substrats comme les acides gras polyinsaturés (**Di Mascio et al., 1991**).

II.5.2.4 Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Ils sont stockés sous forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique (**Lilou et al., 2008**).

Les citroflavonoïdes ou bioflavonoïdes sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes que l'on trouve spécifiquement dans le citrus, présents principalement dans le péricarpe externe des oranges, aussi dans les fleurs et les feuilles. Ils sont antioxydants et améliorent l'absorption de la vitamine C. Ils sont riches en rutine, hespéridine, éryodyctol et naringénine, (**Moys, 1981 ; Bruneton, 1999**).

II.5.2.5 Poly phénols

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre. (**Haleng et al. 2007**).

II.5.2.6 Le Coenzyme Q10 et cytochrome C

L'ubiquinone ou Q10 est connu pour son rôle dans la production de l'énergie au niveau de la mitochondrie. Il agit sous sa forme réduite "ubiquinol" comme antioxydant (**Stocker et al., 1991**).

L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les RL (**Frei et al., 1990**).

Le cytochrome C présent dans l'espace inter membranaire joue un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\bullet-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome C oxydé et de l'eau (**Pereverzev et al., 2003**).

II.5.2.7 L'acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou acide1-ascorbique est la lactone d'un acide hexuronique présentant une parenté étroite avec les sucres en C6. C'est une vitamine hydrosoluble dont la carence totale provoque le scorbut (affection mortelle) et la carence partielle favorise diverses maladies comme les infections, les allergies, l'arthrose, les maladies cardiovasculaires, le stress ou encore le cancer.

Les besoins en vitamine C sont estimés entre 60 et 100 mg/j. Les sources de vitamine C chez l'homme sont uniquement exogènes. Elles se trouvent essentiellement dans les fruits (agrumes, fraises, cassis, kiwi, cynorhodon, acérola), les légumes (choux, choux-fleurs) et certains aliments d'origine animale (viande de bœuf et de porc, foie, rognons, lait de vache).

II.5.2.8 Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes d'une extrême diversité dont les propriétés tannantes sont basées sur le fait qu'ils précipitent de leurs solutions aqueuses certaines protéines de la peau, en particulier la gélatine. Leurs solutions aqueuses ont un caractère acide (**Berard et al.,1947**) .

III. L'acide ascorbique et les Tanins

III.1 L'acide ascorbique

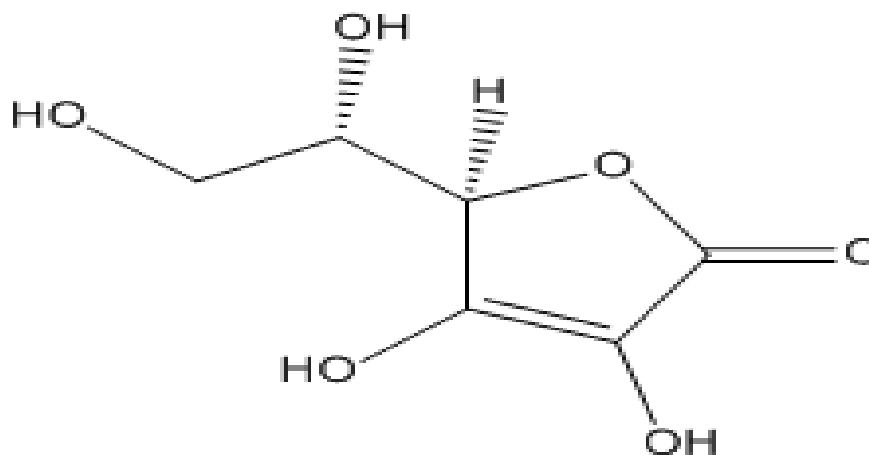
III.1.1 Généralités

La vitamine C fut constatée par Amiral James Lind en 1747, il utilisa du jus de citron pour sauver les marins du scorbut. L'isolement sous forme cristalline de la molécule de vitamine C fut réalisé à partir du jus d'orange, de choux et des glandes surrénales par Albert Szent Györgyi (Lemerini, 2006).

III.1.2 Structure

Le terme de vitamine C est utilisé comme terme générique pour tous les composés possédant l'activité biologique de l'acide L-ascorbique. Ce dernier est également connu sous le nom d'acide L-xylo-ascorbique,

La vitamine C est un acide organique dont la structure est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. L'acide ascorbique comporte une fonction γ lactone, une fonction énediol (HO-C=C-OH) support de son activité biologique et qui confère à la molécule des propriétés acides et deux fonctions alcool (figure 05) (Guilland et al. , 1998) .



Vitamine C

Figure05 : Structure de l'acide L-ascorbique (Robert, 2005).

Les majorités vertébrées sont capables de synthétiser de grandes quantités de vitamine C à partir du glucose alors que l'être humain et la plupart des primates n'ont pas cette capacité et doivent donc obligatoirement avoir cette vitamine dans l'alimentation. La vitamine C est une substance hydrosoluble qui ne peut être stockée dans l'organisme contrairement à des vitamines liposolubles comme la vitamine A et D (Corjon, 2012).

III.1.3 Propriétés physico-chimiques :

Les différentes propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique sont regroupées dans le tableau suivant:

Tableau 06 : Propriétés chimiques et physiques de l'acide ascorbique (Devey et al., 2000 ; Guiland et al., 1998)

Caractéristiques chimiques

Formule brute		$C_6H_8O_6$
Pureté	99,0%	
Masse moléculaire	176,1241 g/mol	
pH	2-3	
pKa	4,70	

Caractéristiques physiques

T° de fusion	190° à 192°
Masse Volumique	1,65
Soluble dans l'eau	1g/3ml (25°)
Soluble dans l'alcool	1g/40ml (25°)

III.1.4 Sources de L'acide ascorbique

Les sources naturelles les plus riches en acides ascorbique sont les fruits et légumes frais tels que les agrumes, le cassis, la goyave, le piment ou persil

La stabilité et la teneur en vitamine C des aliments peuvent être réduites par un stockage prolongé et par la cuisson car l'acide ascorbique est soluble dans l'eau et e. Heureusement, bon nombre de meilleures sources alimentaires de vitamine C, comme les fruits et légumes, sont habituellement consommés crus. En effet, la consommation de cinq portions variées de fruits et légumes par jour peut fournir plus de 200mg de vitamine C (Schagen et al. ,2012)

Tableau 07 : Quelques sources naturelles de la vitamine C (Desaulniers et Dubost, 2007)

Aliments	Portions	(Mg)
Goyave	125ml (½tasse)	199
Poivron rouge, cru ou cuit	125ml (½tasse)	101-166
Poivron vert, cru ou cuit	125ml (½tasse)	54-132
Orange	1 fruit moyen	70
Jus d'orange	125ml (½tasse)	43-66
Fraises	125ml (½tasse)	52

III.1.5 Rôles biologiques de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique intervient dans de nombreuses réactions biochimiques, formant ainsi un couple redox «acide ascorbique/acide déhydro-ascorbique» qui semble être à la base des activités physiologiques de la vitamine C dont :

-En tant que donneur d'électron la vitamine C est un puissant antioxydant hydrosoluble protégeant la peau du stress oxydatif en faisant des dons séquentiels d'électrons pour neutraliser les radicaux libres. Ce stress est causé par l'exposition à la lumière UV (**Padayatty et al. , 2003**).

-La vitamine C joue un rôle important dans le maintien d'un collagène mature et normal, en empêchant l'auto-inactivation de lysyl et de prolyl hydroxylase, considéré comme enzymes clés de la biosynthèse de ce dernier (**Saokar Telang, 2013 ; Boyera et al., 1998**).

-L'acide ascorbique est essentiel pour stimuler le système immunitaire de l'organisme, grâce à ses rôles immunitaires, anti-inflammatoire, antiviral et antibactérien. En raison de ses effets. Il est approprié pour une utilisation dans divers domaines de la médecine, y compris l'immunologie, la toxicologie, la radiobiologie...

-Responsable de l'activation d'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires tels les interleukines. Par conséquent, l'acide ascorbique peut favoriser la guérison des plaies et prévenir l'hyperpigmentation post-inflammatoire. **(Sorice et al., 2014)**.

-Pour ce qui est des maladies cardiovasculaires, la vitamine C est utile pour prévenir une crise cardiaque ou un arrêt vasculaire cérébrale. Les données cliniques et expérimentales proposent que la carence latente chronique en vitamine C entraîne une hypercholestérolémie et l'accumulation du cholestérol dans certains tissus. La supplémentation en acide ascorbique aboutit généralement à une réduction significative de la concentration plasmatique du cholestérol **(Turley et al., 1976)**. Certaines études suggèrent que la vitamine C peut ralentir la progression de l'athérosclérose. Il contribue à prévenir les dommages du mauvais cholestérol (LDL), qui s'accumule comme des plaques dans les artères. D'autres études suggèrent que la vitamine C peut aider à garder les artères flexibles **(Ehrlich, 2013)**.

-La vitamine C en doses élevées semble être sans danger pour la majorité des individus. De nombreuses preuves épidémiologiques indiquent la capacité de l'acide ascorbique à prévenir le cancer à un certain nombre de sites y compris le cancer de la peau, la dysplasie cervicale de l'estomac, des poumons, du colon, de la prostate et du sein. En outre ces mécanismes comprennent l'amélioration du système immunitaire, l'inhibition de l'hyaluronidase pour prévenir les métastases, et enfin l'amélioration des effets de certains médicaments de chimiothérapie en réduisant la toxicité **(Head, 1998)**.

-Le régime alimentaire riche en antioxydants comme la vitamine C, diminue le risque d'hypertension artérielle **(Ehrlich, 2013)**.

-Selon des études récentes, en prenant 6 à 10 g de vitamine C chaque jour, on se met à l'abri de nombreux rhumes et sinusites, car une dose élevée en vitamine C, double le rythme de production de lymphocytes qui jouent un rôle important dans les défenses immunitaires **(Leprince, 2011)**.

-La vitamine C a été utilisée dans la prise en charge de l'infertilité masculine sur des bases empiriques, en particulier en présence d'infections séminales non spécifiques. La supplémentation en vitamine C chez l'homme peut améliorer la qualité du sperme et augmente également les taux de progestérone chez les femmes infertiles présentant un défaut de phase lutéale (**chambial et al., 2013**).

III.1.6 Synergie thérapeutique de la vitamine C

En présence d'autres antioxydants comme les vitamines E, A, K, celles du groupe B, la biotine, les flavonoïdes comme la quercétine, les anthocyanosides, les minéraux comme sélénium, l'action de la vitamine C est démultipliée. Les taux sanguins nécessaires pour être efficaces sont beaucoup plus faibles (de l'ordre de dix fois moins, de six gr/l à 0,7 gr/l) (**Julien, 2017**).

III.2 Les tanins :

Les tanins sont des molécules à poids moléculaire élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques. Ainsi, les tannins se réfèrent à l'acide tannique, il a une structure qui est composé d'un glucose centrale et 10 groupes galloyl, ce sont des poly phénols soluble dans l'eau (**Gulçin et al. 2010**). Existents dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles ; fruits et racines .Leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 Da (**Cowan, 1999**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

Les tanins condensés, formés de pro anthocyanidines (sous forme d'oligomères).

III.2.1 Les tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acide phénols, la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des dicotylédones, on le rencontre notamment chez les rosidaes dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturation. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupement (-OH) se dissolvent plus ou moins (en fonction de leurs poids moléculaires) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guignard, 1996**)

Structure :

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central de glucose et de chaîne latérale (en position 1,2,3,4 ou 6 sur le glucose) comprenant un à n monomères (S) d'acide phénol. Des liaisons carbones à carbone entre noyaux (liaison bi-phényles réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins ellagiques (Guignard, 1996). (Figure 06).

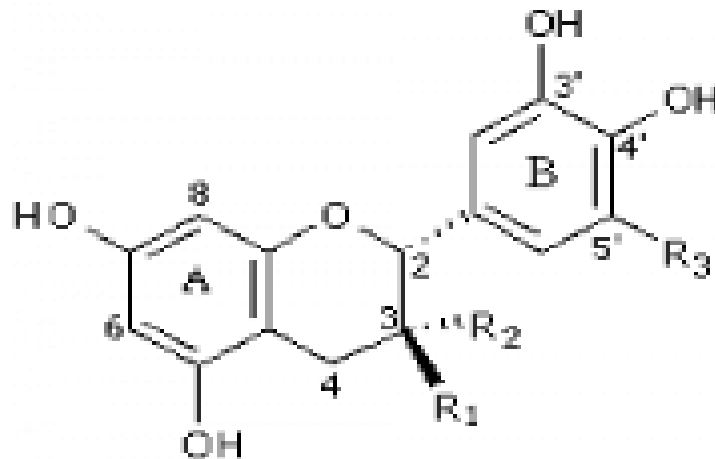


Figure 06 : Structure chimique des tanins hydrolysables (Guignard, 1996).

III.2.2 Les tanins condensés :

Les tanins condensés ou pro-anthocyanidols, non hydrolysables résultant de la polymérisation d'unités flavan-3-ols. Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudo-colloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois de cœur. La disparition des tanins, lorsque les fruits ont atteint leur maturation, montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être réutilisés par la plante (Gavot, 2009).

Structure :

La structure complexe des tanins condensés (figure 07) est formée d'unités répétitives monomériques (flavan-3-ols) qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles des carbones monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (Di-hydroxylées) et les gallo catéchines (Tri-hydroxylées) (**Hemingway, 1992**).

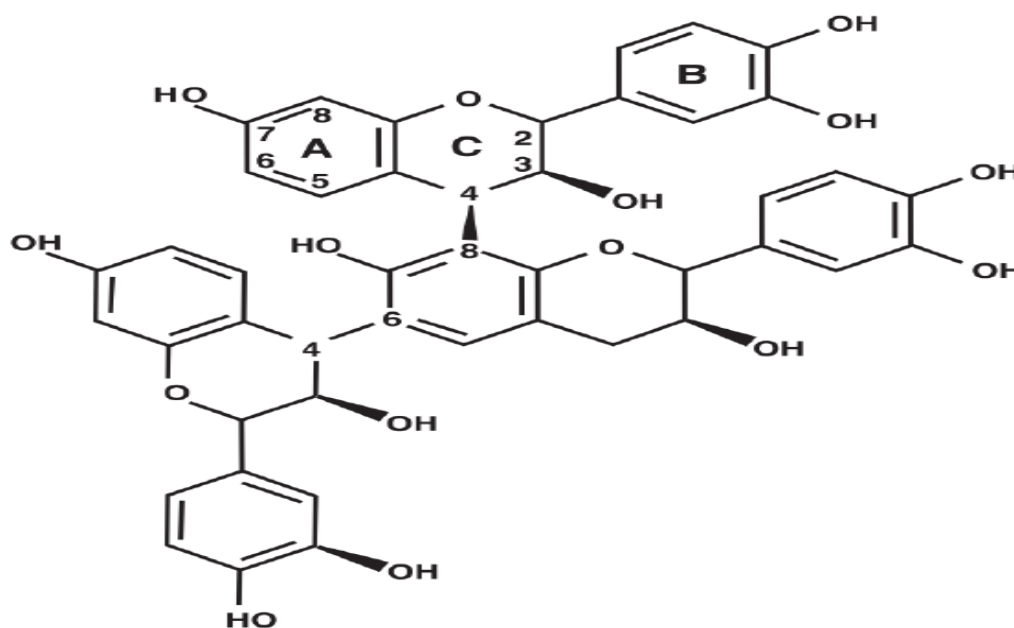


Figure 07: Structure chimique des tanins condensés (**Hemingway, 1992**).

Les tanins contiennent de nombreux groupements hydroxyle (sur les noyaux phénoliques), ce qui leur permet de former des complexes insolubles avec des hydrates de carbone, des protéines et des ions métalliques (**Bravo, 1998**).

Ils se lient à la quasi-totalité des protéines solubles, donnant naissance à des polymères insolubles à pH et force ionique normaux. Cette complication, dépendant du pH, est donc réversible cette réaction avec les protéines est à l'origine de nombreux effets biologiques des tanins. Les enzymes complexées de cette façon montrent une réduction marquée de leur activité (**Haslam, 1996**).

III.2.3 Rôles :

Les tanins sont d'efficaces moyens de défense contre les herbivores, mais on suppose que leur rôle majeur dans l'évolution a été de protéger les plantes des attaques fongiques et bactériennes. Leur intérêt médical réside essentiellement dans leur caractère astringent, leur propriété de coaguler les albumines des muqueuses et des tissus, en créant ainsi une couche de coagulation isolante et protectrice, ayant pour effet de réduire l'irritabilité et la douleur et d'arrêter les petites saignements (**Lamnaouar, 2002**)

Les tanins ont un effet protecteur sur les reins, on les utilise aussi dans les secours immédiats de maux de gorge, contre les diarrhées, la dysenterie, l'hémorragie, la fatigue, les ulcères cutanés et comme cicatrisant sur les blessures gangréneuses (**Bajaj, 1999**)

Certains tanins auraient des propriétés anti-oxydantes. Au cours de ces dernières années, les tanins ont également été étudiés pour leurs potentiels anticancéreux par le biais de différents mécanismes (**Galvi et al. 1995**).

III.2.4 Propriétés antioxydants des tannins :

Son mécanisme antioxydant est encore loin d'être complètement compris. En présence de cuivre métallique l'acide tannique agit comme un pro oxydant, ou comme un antioxydant supprimeur du radical hydroxyle (**Gulçin et al. 2010**). Comme beaucoup de poly phénols, l'acide tannique possède des propriétés antimicrobiennes.

Matériel et méthode

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (**PPABIONUT**), faculté des sciences de la nature et de la vie ; de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen.

I. Protocole expérimental

I.1 Matériel végétal :

Notre travail a porté sur l'étude des propriétés physicochimiques et antioxydants de l'écorce de la clémentine (*Citrus clementina*) cultivée en Algérie.

I.2 Préparation des extraits des peaux sèche de clémentine :

L'écorce est séparée de la clémentine fraîche, séchée à l'air à température ambiante pendant environ une semaine à dix jours. Après séchage l'écorce est finement broyée à l'aide d'un mixeur électrique puis tamisée.

L'élimination de la matière grasse est une étape clé qui précède les dosages des métabolites secondaires, elle optimise le rendement en extrait. La poudre de plante dégraissée ainsi obtenue est appelée **tourteau**. L'utilisation du tourteau, au lieu de la plante non dégraissée, facilite la préparation des solutions homogènes lors des analyses et empêche la formation des émulsions dues à la présence des lipides (**Yu et Dahlgren, 2005**).

I.3 Extraction sélective des tanins :

L'extraction des tannins a été effectuée selon la méthode adaptée par (**Zhang et al., 2008**).

Mode opératoire

Dix gramme de poudre végétale dégraissée sont ajoutés à 200 ml du mélange acétone – eau (170/30) ml, (85/15)(v/v). La macération dure 3 jours à température ambiante. Après filtration et élimination de l'acétone, la phase aqueuse est reprise dans du dichlorométhane (2 x 50 ml) afin d'éliminer les pigments et les traces des lipides, en utilisant une ampoule à décanter. La phase aqueuse lavée est extraite avec 4 X 50 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des phases acétate éthylique récupéré est évaporé à sec à 40°C par un rota vapeur type HAHNVAPOR-Model : H-S-2005V-N, le résidu est repris par 3ml de méthanol.

I.4 Préparation des dilutions de la vitamine C et de tanins:

Des dilutions sont préparées à partir de la solution mère de vitamine C à 40% (40 g dans 10 ml de PBS), afin d'obtenir les concentrations finales suivantes (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 et 0.062 mg/ml).

La même procédure a été répétée avec la solution mère de Tanins pour obtenir les mêmes concentrations finales.

Les dilutions des combinaisons vitamine C/tanins sont préparées par la même procédure mais à différentes concentrations :

Vitamine C 75% et tanins 25% (750µl/250µl).

Vitamine C 50% et tanins 50% (500µl/500µl).

Vitamine C 25% et tanins 75% (250µl/750µl).

II. Test d'hémolyse :

Principe

Le principe de ce test consiste à soumettre une suspension d'hématies à une agression oxydante (production contrôlée des radicaux libres). La lyse des cellules sanguines est induite par un générateur des radicaux libres le TBHP, les érythrocytes ainsi libèrent tout leur équipement enzymatique et moléculaire pour résister à cette agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu (**Lesgard, 2000**). Les cellules utilisées sont d'origine humaine à donneur unique. Les lectures spectrophotométriques successives permettent de mesurer les variations de turbidité du milieu réactionnel au cours du temps.

Mode Opératoire :

Un volume de 10ml de sang est prélevé dans des tubes héparines puis centrifugés à 2000t/min pendant 10 minutes, pour l'obtention du plasma et d'un culot de cellules sanguines. Trois lavages successifs sont effectués avec du tampon phosphate et centrifugés à chaque fois à 2000 t/min pendant 10 minutes. Le plasma est éliminé et le culot contenant les érythrocytes est récupéré et dilué dans un tampon phosphate pour obtenir un hématocrite de 2%. La réaction a lieu dans des tubes à hémolyse où 1 ml de la solution d'érythrocytes à 2%

est mélangé avec 50 µl de différentes concentrations de vitamine C, de tanins et des deux combinés à la fois. Après incubation pendant 30 min à 37 C° sous agitation, 5 µl de TBHP sont ajoutés. Après homogénéisation, le milieu réactionnel est sous agitation à une température de 37C° permettant au régénérateur de produire les radicaux libres pendant 2 heures. Après incubation, les érythrocytes sont préparés pour une hémolyse totale afin de doser les paramètres du stress oxydatif et de calculer le taux d'hémolyse.

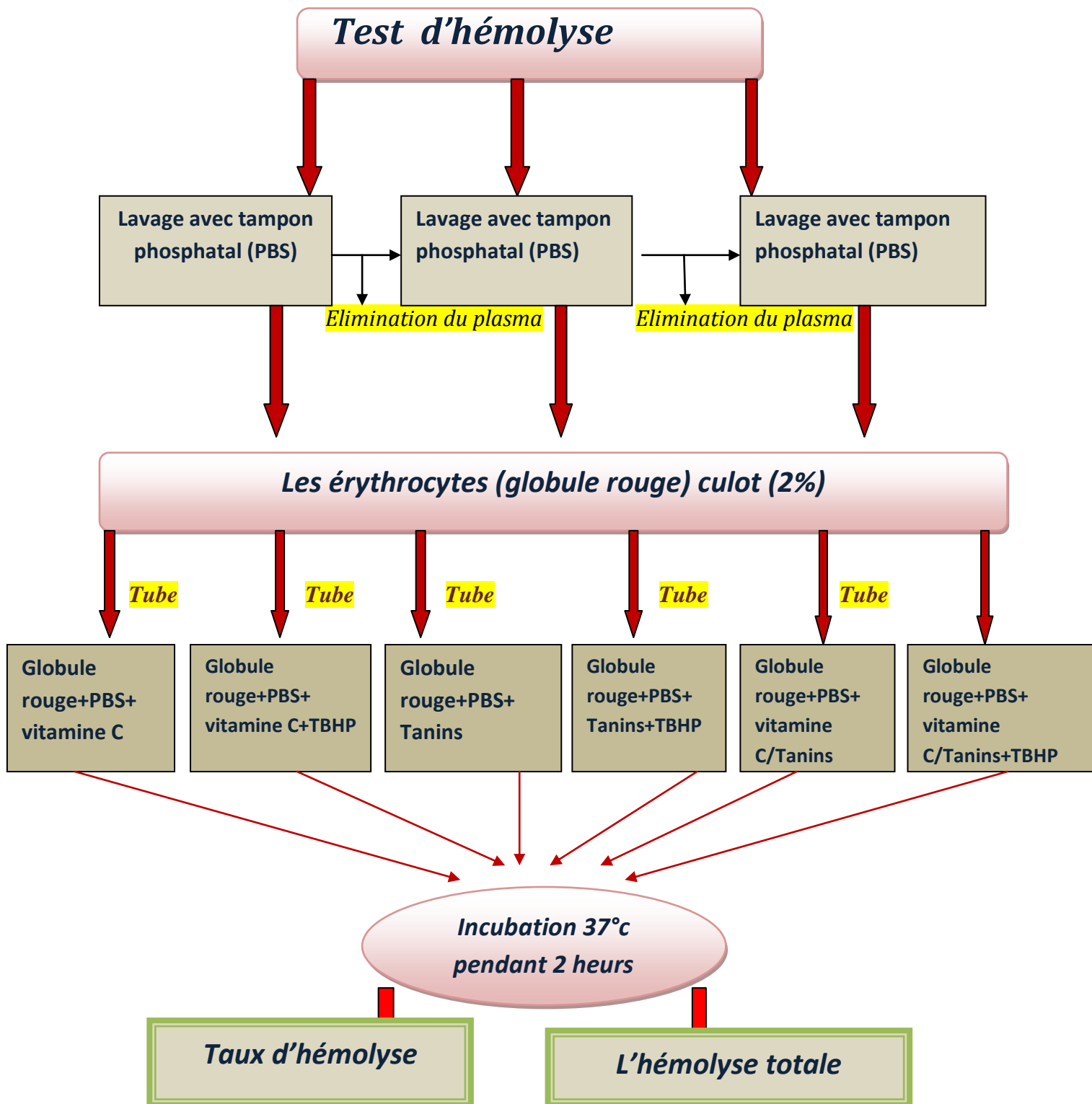


Figure 08 : organigramme qui présente le test d'hémolyse

II.1 Taux d'hémolyse :

Un volume de 100 µl des différents échantillons sont introduits dans des tubes auxquels sont ajoutés 900 µl de PBS. Le mélange réactionnel est centrifugé à 2000 t/ min pendant 10 min et la densité optique du surnageant est mesurée à 545 nm contre le blanc (le PBS).

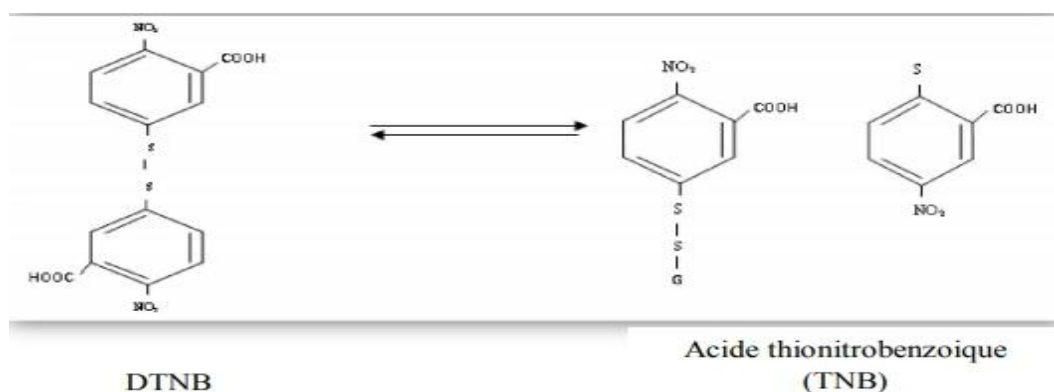
II.2 Hémolyse Totale

Dans des tubes, 100 µl d'échantillon sont introduits, puis 900 µl d'eau distillée glacée à 4 C° sont ajoutés. Le mélange est agité et incubé pendant 15 min à 4 C°. Après incubation, une hémolyse mécanique des échantillons est provoquée à l'aide de pipette pasteur, puis une centrifugation est réalisée à 3000t/min pendant 10 min. La DO du surnageant permet déterminer le taux d'hémolyse.

II.2.1 Dosage des glutathion GSH (Ellman, 1959)

Principe :

Le dosage du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) (ELLMAN, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante :



Le thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 405 nm avec un coefficient d'extinction égal à 13,6 mM⁻¹.cm⁻¹

II.2.2 Dosage du malondialdéhyde (MDA) (Nourooz-Zadeh et al., 1996)

Principe :

Le malondialdéhyde (MDA) plasmatique, est traité avec un acide à chaud les aldéhydes réagissent avec TBA formant une condensation chromogénique de couleur rose et/ou jaune consistant en 2 molécules de TBA et une de molécule de MDA.

La concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ; $\epsilon = 1,56.10^5 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$

III. Etude statistique :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes plus ou moins l'erreur standard(ES). L'évaluation des résultats est réalisée par l'analyse de variance par la comparaison des moyennes entre d'extraits (Vitamine C, tannin et vitamine C/tanin) combinés ou non aux TBHP à différentes concentrations par le test « t » de Student. Tous les calculs sont réalisés à l'aide des fonctions statistiques (moyenne, écart type, test student) à l'aide de Microsoft Excel.

Les différences significatives sont marquées a :

* $p < 0.05$ différence significative.

** $p < 0.01$ différence très significative.

*** $p < 0.001$ différence hautement significative.

Résultats et interprétation

I. Statut oxydant/antioxydant

I.1. L'acide ascorbique

I.1.1 Teneurs érythrocytaires du taux d'hémolyse en présence de l'acide ascorbique (figure 09)

Le taux d'hémolyse présente une élévation lorsque les érythrocytes sont mis en présence de la vitamine C combinée au TBHP par rapport à la vitamine C non combinée au TBHP. Lorsque la vitamine C est non combinée au TBHP le taux d'hémolyse varie entre 30% et 45% pour les différentes concentrations. Par ailleurs les concentrations (0.25 et 0.125)mg/ml de la vitamine C combinée au TBHP par rapport à la vitamine C seul ne montrent aucune différence en terme de taux d'hémolyse.

I.1.2 Teneurs érythrocytaires de GSH en présence de l'acide ascorbique (figure 10)

Les teneurs érythrocytaires en GSH présentes une diminution lorsque la vitamine C est combinée au TBHP comparée à la vitamine C non combinée au TBHP. Cependant le degré de signification est variable d'une concentration à une autre. Il est significative pour la concentration 4 mg/ml en vitamine C, très significative pour les concentrations (2 ; 1 ; 0,5) mg/ml et hautement significative pour les concentrations (0.25 ; 0,125 et 0,062) mg/ml.

I.1.3 Teneurs érythrocytaires de MDA en présence de l'acide ascorbique (figure 11)

Les résultats des teneurs en MDA montrent des fluctuations en fonction des concentrations en vitamine C mais aussi sa combinaison avec le TBHP. Les faibles concentrations en vitamine C non combinées (0,062 ; 0,125) mg/ml diminuent les teneurs en MDA comparées à la vitamine C combinée au TBHP. A l'inverse la vitamine C combinée au TBHP diminue les teneurs en MDA pour les concentrations les plus élevées (0,5 ; 1 ; 2 et 4) mg/ml et ceci pour les mêmes comparaisons. Cependant la concentration (0,25) mg/ml en vitamine C ne montre aucune différence entre la vitamine C non combinée au TBHP la vitamine C combinée au TBHP

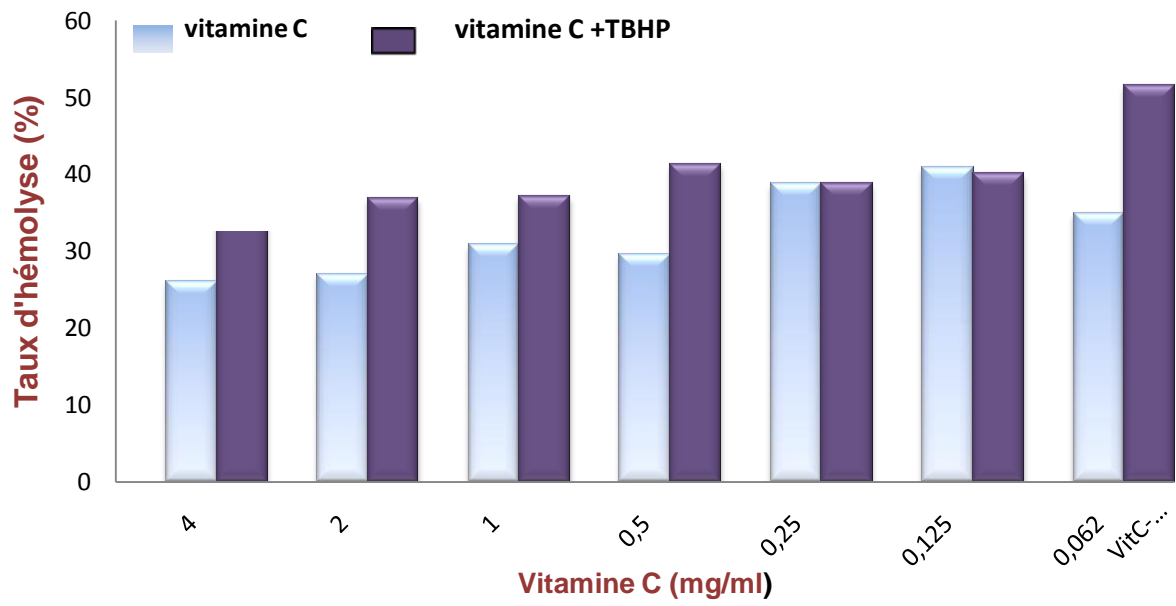


Figure09 : Effet de différentes concentrations de vitamine C combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage.

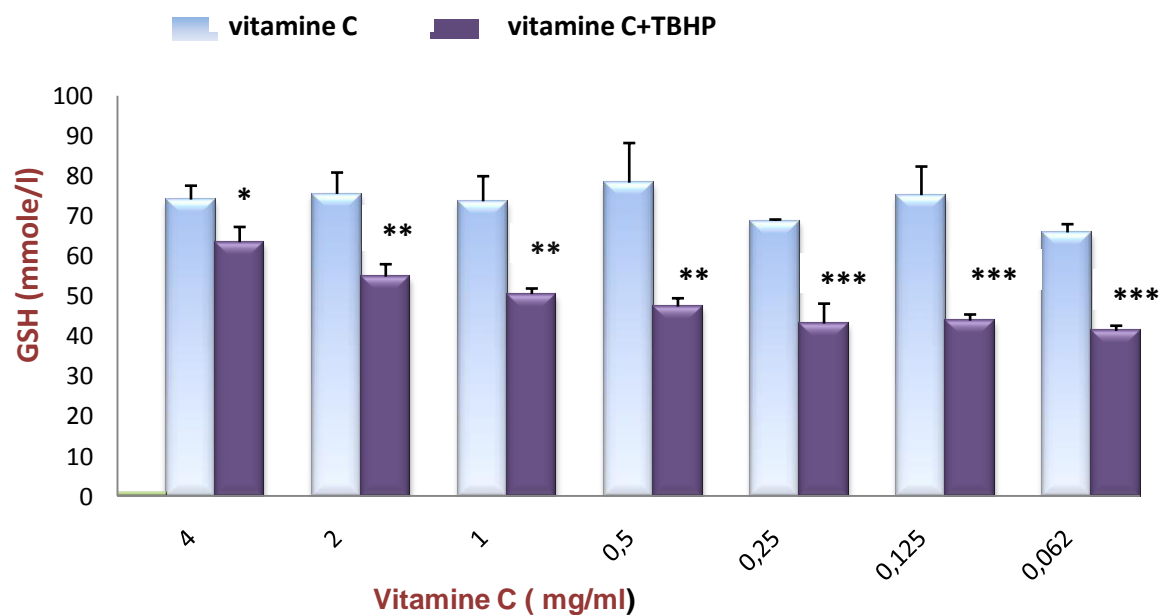


Figure 10 : Effet de différentes concentrations de vitamine C combinées ou non au TBHP sur les teneurs du GSH érythrocytaire

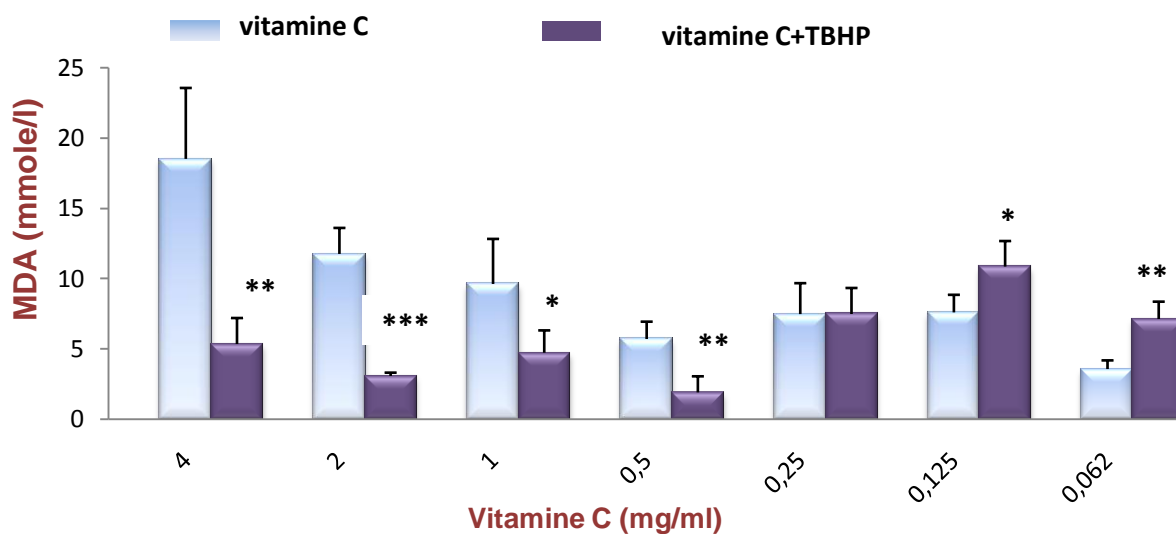


Figure 11 : Effet de différentes concentrations de vitamine C combinées ou non au TBHP Sur les teneurs du MDA érythrocytaire

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les différentes concentrations vitamine C seules ou associées au TBHP est réalisée par le test « t » de Student pour les différents paramètres.

Les différences significatives sont marquées a : * $p < 0.05$ différence significative. ** $p < 0.01$ différence très significative. *** $p < 0.001$ différence hautement significative.

I.2 Tanins

I.2.1 Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des tanins (figure12)

Le taux d'hémolyse présente une élévation lorsque les tanins sont combinés au TBHP comparé aux tanins non combinés au TBHP. Pour les différentes concentrations 4 et 0.5 mg/ml cette élévation varie autour de 25% et 21%. Cependant pour les faibles concentrations (0.25, 0.125 et 0.062) mg/ml de tanins combinés au TBHP le taux d'hémolyse est élevé et est au alentour de 72% et 81%.

I.2.2 Teneurs érythrocytaires de GSH en présence des tanins (figure13)

Les résultats des teneurs du GSH montrent des fluctuations en fonction des concentrations en en tanins mais aussi sa combinaison avec le TBHP. Les faibles concentrations en tanins non combinés (0,25 ; 0,125 ; 0,062) mg/ml augmentent les teneurs en GSH comparées aux tanins combinée au TBHP. A l'inverse les tanins combinés au TBHP augmentent les teneurs en GSH pour les concentrations les plus élevées (0,5 ; 1 ; 2 et 4) mg/ml et ceci pour les mêmes comparaisons.

I.2.3 teneurs érythrocytaires de MDA en présence des tanins (figure14)

Les résultats des marqueurs du stress oxydant (MDA) n'ont montré aucune différence significative entre tanins combinée au TBHP et tanins non combinés pour les concentrations (4, 2, 0.125, 0.062) mg/ml. Cependant une diminution significative est notée lorsque les tanins sont combinée au TBHP comparée au tanin non combinés et ceci pour les concentrations (1 et 0,5) mg/ml. Par ailleurs une augmentation significative des teneurs en MDA est notée pour la concentration 0,25 mg/ml des tanins combinés au TBHP par rapport aux tanins non combinés

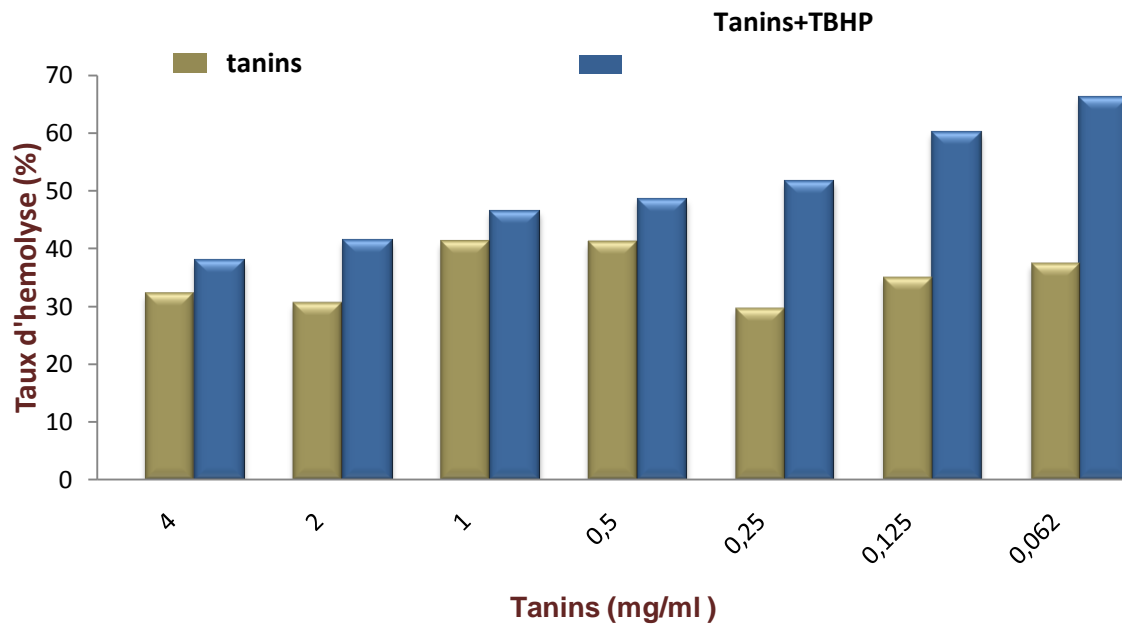


Figure12 : Effet de différentes concentrations de tanins combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage.

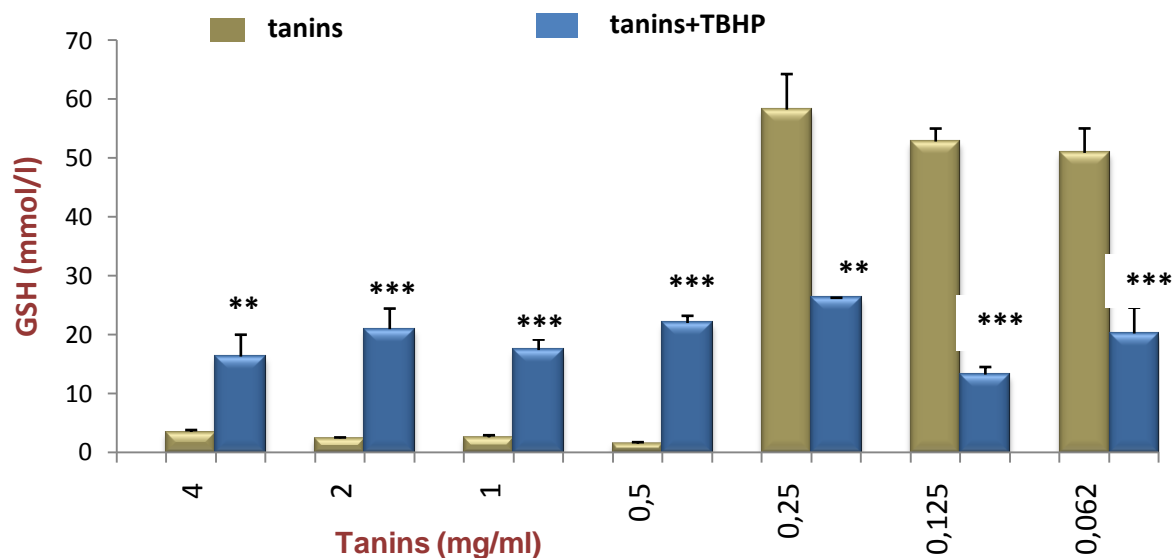


Figure13 : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du GSH érythrocytaire

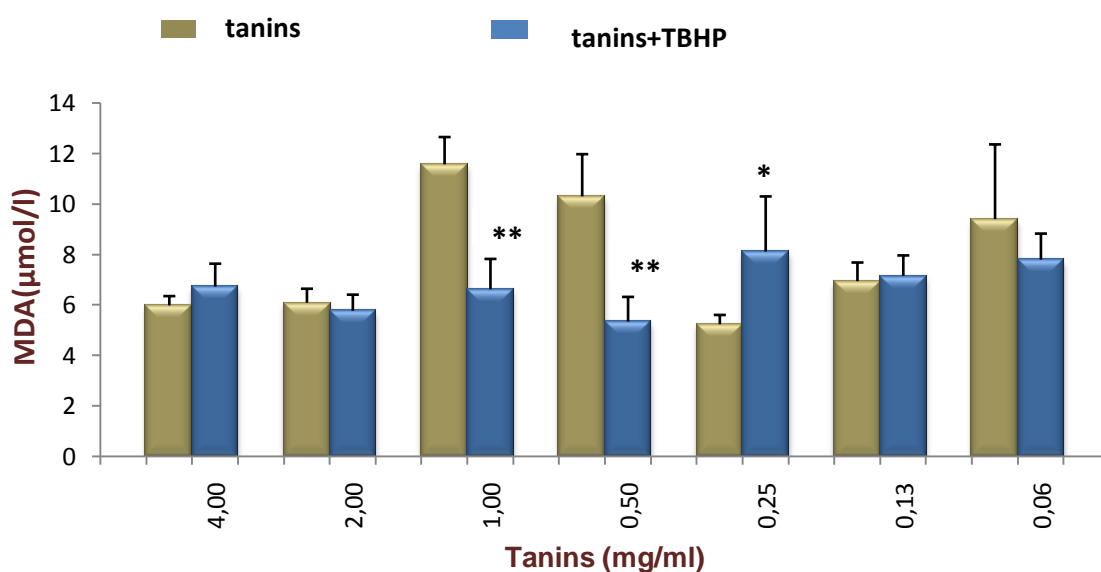


Figure14 : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du MDA érythrocytaire

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les différentes concentrations de tanins seuls ou associées au TBHP est réalisée par le test « t » de Student pour les différents paramètres.

Les différences significatives sont marquées a : * $p < 0.05$ différence significative. ** $p < 0.01$ différence très significative. *** $p < 0.001$ différence hautement significative.

I.3 Acide ascorbique combiné aux tanins :

I.3.1 Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence d'acide ascorbique combiné aux tanins (figure 15) :

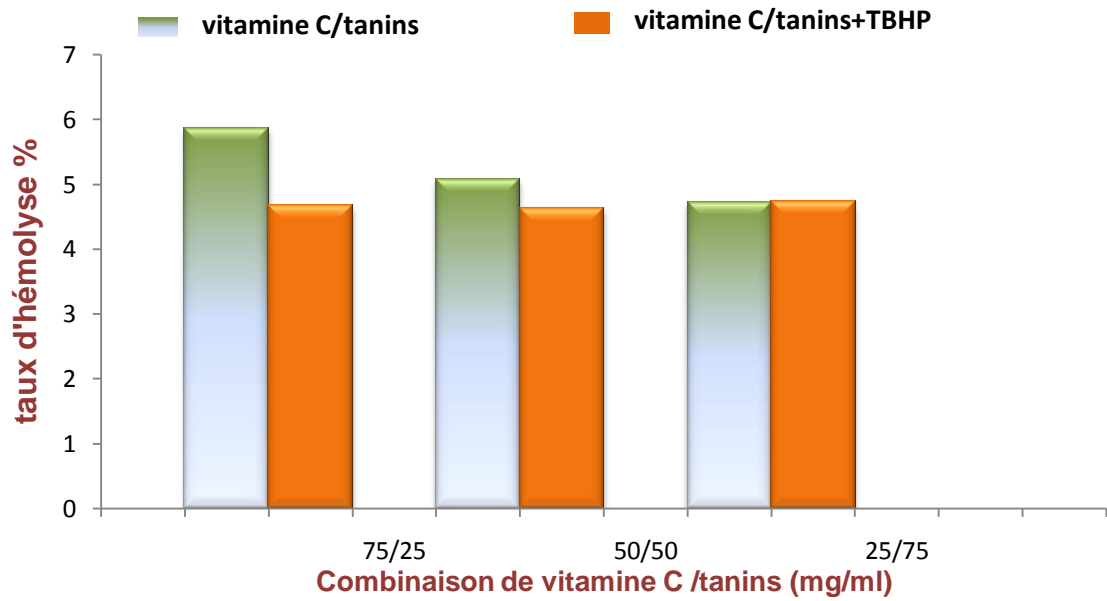
Le taux d'hémolyse présente une élévation pour l'extrait de vitamine C/tanins non combiné au TBHP par rapport à l'extrait combiné au TBHP pour les pourcentages 75/25% et 50/50%. Par ailleurs le pourcentage /de 25 % vitamine C/75% tanins non combiné au TBHP par rapport à l'extrait combinée au TBHP ne montre aucune différences en terme de taux d'hémolyse.

I.3.2 Teneurs érythrocytaires de GSH en présence d'acide ascorbique/tanins (figure 16) :

Les teneurs érythrocytaires en GSH présentes une augmentation hautement significative pour les pourcentage de combinaisons 75%/25% et 50%/5% de vitamine C/tanins en présence du TBHP. Cependant aucune différence n'est observée pour la combinaison de 25% vitamine C/75% tanins En présence du TBHP ou en son absence.

I.3.3 Teneurs érythrocytaires de MDA en présence d'acide ascorbique/tanins (figure 17) :

Les teneurs en MDA sont diminuées de façons très significative pour la combinaison 75 % Vitamine C/25% tanins combinée au TBHP comparées à l'extrait non combiné au TBHP.



. *Figure15 : Effet de différentes combinaisons de vitamine C/tanins combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse*

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage.

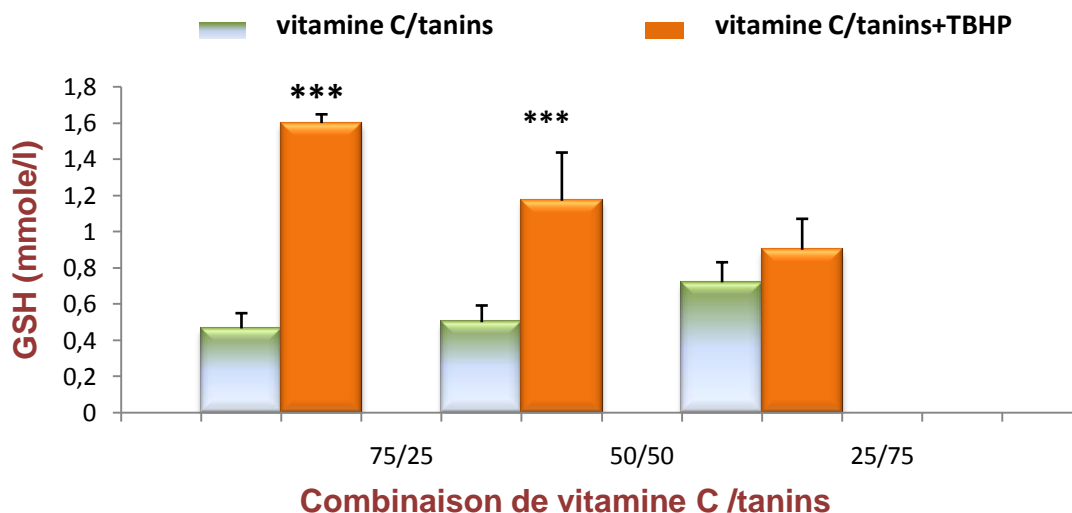


Figure 16 : Effet de différentes combinaisons de vitamine C/tanins combinées ou non au TBHP sur

Les teneurs du GSH érythrocytaire

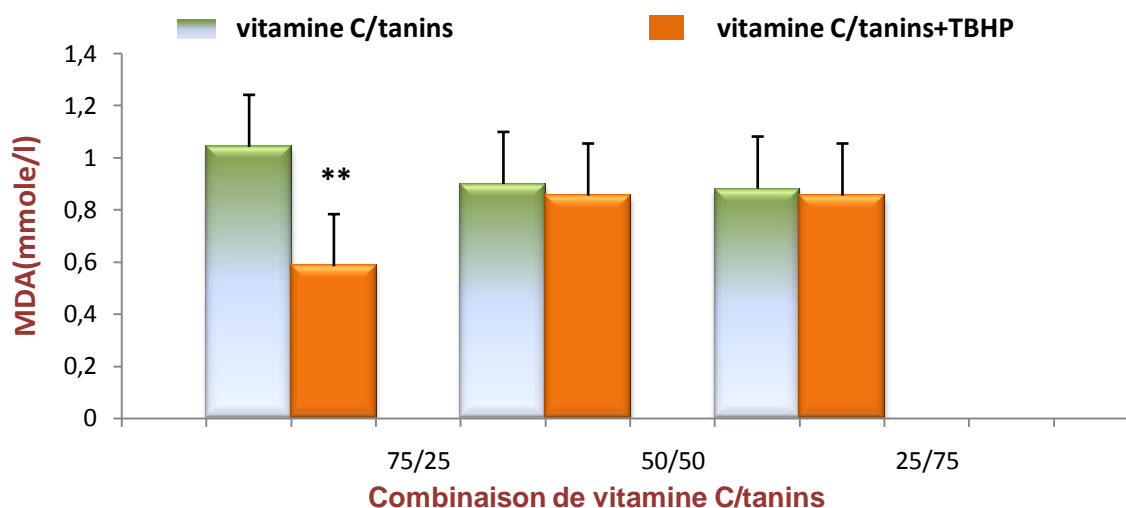


Figure 17 : Effet de différentes combinaisons de vitamine C/tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du MDA érythrocytaire

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les différentes combinaisons (vitamine C/tanins) seules ou associées au TBHP est réalisée par le test « t » de Student pour les différents paramètres.

Les différences significatives sont marquées a ; ** p < 0.01 différence très significative ;

*** p < 0.001 différence hautement significative.

Discussion

La vitamine C, acide L-ascorbique est un composé organique hydrosoluble, très répandue dans le monde vivant, elle joue un rôle dans l'activation enzymatique et la réduction du stress oxydant (**Koechlin et ramonzyko., 2006**) Les tanins que l'on trouve spécifiquement dans l'écorce des différentes variétés d'agrumes, sont des composés phénoliques solubles dans l'eau (**Frutose et al., 2004**). Ce sont des pigments neutralisant les radicaux libres de part leurs activités des antioxydants (**Jagetia et al., 2003**).

Ce travail vise mettre en évidence l'impact de différentes concentrations de la vitamine C et des tanins sur l'intégrité de la membrane des érythrocytes. Au cours de ce travail nous avons aussi étudié la capacité antioxydant de la vitamine C combiné aux tanins.

Les érythrocytes sont considérés comme une cible de choix pour l'attaque des radicaux libres en raison des teneurs élevées en AGPI dans leurs membranes, aussi ils sont des promoteurs puissants des espèces oxygénées réactifs (ROS), l'exposition des érythrocytes à des conditions oxydatifs résultent en la formation des radicaux libres qui conduisent finalement à la lyse cellulaire.

L'hémolyse est le meilleur modèle utilisé pour évaluer au mieux l'étude des dommages oxydatifs des membranes induits par les radicaux libres générés et déterminer l'activité antioxydant des extraits. Le TBHP est un des générateur de radicaux libres (**Niki et al., 1988 ; Chwalek et al., 2006; Kunwar et al., 2007; Deng et al., 2006;**).

Nos résultats ont montré que l'addition de la vitamine C aux érythrocytes à des concentrations élevée (4, 2, et 1) (mg/ml) entraîne une meilleure protection contre l'hémolyse oxydative. A l'inverse, l'addition de la vitamine C à des concentrations moins élevées (0.5, 0.25, 0.125, et 0.062) mg/ml aux érythrocytes entraîne une moindre protection contre l'hémolyse oxydative. Ceci est observé en absence de l'agent pro-oxydant le TBHP. Ces résultats témoignent de l'activité antioxydant de la vitamine C. En présence du TBHP, l'addition de la vitamine C aux érythrocytes à la concentration 4 mg/ml montre que le taux d'hémolyse est le plus bas comparé aux autres concentrations, En effet, la vitamine C protège les globules rouges de l'hémolyse par piégeage des radicaux libérés par le TBHP. Ce rôle antioxydant de vitamine C découle de ses propriétés réductrices.

Ces données concordent avec les travaux de **Karabinas (1984) et Haleng et al. (2007)** En effet la vitamine C est capable de piéger les radicaux libres générés par le TBHP en cédant l'hydrogène de leurs groupements hydroxyles (**Sandhar et al., 2011**). Pour la plus petite concentration de vitamine C 0.062 (mg/ml) le taux d'hémolyse augmente comparé à la concentration la plus élevée (4 mg/ml). Ceci prouve que le taux d'hémolyse est inversement proportionnel à la concentration de la vitamine C.

Il est reconnu que l'apport de fortes doses de vitamine C (jusqu'à 2000mg/jr) n'a pas été signalé de façon constante à l'entraînant des effets secondaires. (**Retsky, Chen, Zeind, Frei, 1999**)

Pour les tubes contenant les érythrocytes en présence de l'extrait des tanins, nos résultats montrent que le taux d'hémolyse diminue à chaque fois que la concentration des tanins augmente. Ceci est attribué à l'effet antioxydant des polyphénols qui diminue l'hémolyse (**Fleurie et al, 2005**) en effet a nature poly-phénolique hydrophobe de l'acide tannique est responsable de l'action antioxydant (**Gulçin et al.,2010**).

En ce qui concerne l'association de la vitamine C aux tanins, la protection des érythrocytes de l'hémolyse est la meilleure quand les tanins est en plus grande proportion (75% de tanin/t 25% de la vitamine C).

Concernant les teneurs érythrocytaires en GSH, nos résultats montrent que la vitamine C non combiné au TBHP augmente les teneurs en GSH comparé à la vitamine C combiné au TBHP et ce quelque soit la concentration en vitamine C. Le glutathion participe à transformer la forme oxydée de l'acide ascorbique en [vitamine C](#) et à stimuler son pouvoir antioxydant.

Selon nos résultats, les concentrations élevées en tanins (4 ; 2 ; 1 et 0,5) mg/ml combiné au TBHP augmente les teneurs érythrocytaires en GSH comparé aux tanins non combiné au TBHP. Cependant le pourcentage de signification est variable en fonction des concentrations en tanins. Ceci est expliqué par la capacité des tanins à piéger les radicaux libres générés par le TBHP en cédant l'hydrogène de leurs groupements hydroxyles.

Les teneurs érythrocytaires en GSH montrent que l'association de la vitamine C et tanins combiné au TBHP augment très significative par rapport au non combiné au TBHP qui diminue.

Concernant la peroxydation lipidique, nos résultats ont montré des fluctuations dans les teneurs en MDA en fonction des concentrations en vitamine C combinée ou non au TBHP. Une diminution très significative des teneurs en MDA est observée lorsque la vitamine C combinée au TBHP pour les concentrations (4 ; 2 ; 1 et 0,5) mg/ml, par rapport à la vitamine C non combinée. Ce ci suggère que la Vitamine C s'oppose à l'initiation de la peroxydation lipidique par piégeage ce qui traduit sa capacité à neutraliser les radicaux libres générés par le TBHP diminuant ainsi le taux de MDA (**Valko et al., 2006; Jonsson et al., 2003**). Cependant à de plus petites concentrations de vitamine C (0.125, et 0.062) mg/ml, nos résultats montrent que les teneurs en MDA érythrocytaire ne diminuent pas en présence du TBHP.

Les teneurs érythrocytaires en MDA présentent des fluctuations stables en ce quelque soit la concentration des tanins soit combinés ou non au TBHP, à l'inverse une augmentation très significative en taux de MDA pour les concentrations (1-0,5) mg/ml des tanins non combinés au TBHP. L'effet pro-oxydant des polyphénols précisément tanins du à leur capacité à interagir avec les ions métalliques principalement le fer ferrique entraînant la production des EOA notamment le radical hydroxyle via la réaction de Fenton mais aussi à sa capacité à réagir avec l'O₂ en produisant l'anion superoxyde. (**Fukumoto et Mazza, 2000**).

Les teneurs érythrocytaires en MDA ne présentent aucune différence entre les pourcentages (50/50% et 25/75%) des combinaisons vitamine C et tanins associés ou non au TBHP, contrairement pour le pourcentage 75/25% (75% vitamine C et 25% tanins) qui à la meilleur protection. **Peyrat-Maillard; al., (2003)** ont suggéré que la combinaison des antioxydants agit d'une manière de régénération selon nos résultats c'est la grande proportion de vitamine C qui joue ce rôle de régénération.

Conclusion

Conclusion

L'écorce de la clémentine (*citrus clémentina*) constitue un gisement riche en ingrédients fonctionnels connus pour leurs activités anti-oxydantes. La vitamine C et les poly phénols sont de puissants antioxydants présents dans l'écorce. Cependant l'activité biologique des tanins, fraction des poly phénols est peu connue.

Ce travail a pour objectif d'étudier l'effet protecteur *in vitro* de la vitamine C et des tanins vis-à-vis des dommages oxydatifs sur les érythrocytes.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'impact de différentes concentrations de la vitamine C, des tanins, ainsi que leurs combinaisons sur les érythrocytes. Ceci, afin de relever les concentrations et la combinaison qui protègent le mieux des dommages oxydatifs.

En ce qui concerne le taux d'hémolyse :

- Les concentrations (4, 2,1) mg/ml de la vitamine C non combinée au TBHP donnent une meilleure protection contre l'hémolyse des érythrocytes.
- Lorsque les érythrocytes sont mis en contact avec les tanins non combinés au TBHP le taux d'hémolyse est le plus bas à la concentration de 0,25 mg/ml.
- Pour les combinaisons vitamine C/tanins, le taux d'hémolyse est le plus bas en présence du TBHP pour les proportions suivantes 75% vitamine C/25% tanins et 50% vitamine C/50% tanins.

En ce qui concerne les teneurs en GSH érythrocytaires sont augmentées :

- En présence de la vitamine C non combinée au TBHP et ce quelque soit sa concentration autrement dit, La vitamine C peut augmenter les teneurs en GSH en dehors d'un stress oxydatif.
- En présence de tanins non associés aux TBHP et ce pour les concentrations les plus faibles (0.125, 0.25, 0.062) mg/ml.
- Quand les tanins sont associés aux TBHP et ce pour les concentrations les plus élevées (4, 2, 1 et 0.5) mg/ml.
- Lorsque la vitamine C est une grande proportion par rapport aux tanins (75% de la vitamine C et 25% de tanin).

En ce qui concernant les teneurs en MDA :

- la peroxydation lipidique est diminuée en dehors d'un stress oxydant lorsque la vitamine C est associée au TBHP par rapport à la vitamine C non associée au TBHP pour les concentrations (4, 2, 1,0.5) mg/ml autrement dit, la vitamine C s'oppose à l'initiation de la peroxydation lipidique par piégeage ce qui traduit sa capacité à neutraliser les radicaux libres générés par le TBHP diminuant ainsi le taux de MDA.
- Concernant les tanins la peroxydation lipidique présente des fluctuations en fonction de la concentration des tanins mais aussi à leurs combinaisons aux TBHP. En absence du TBHP la peroxydation lipidique est diminuée pour la concentration de 0,25 mg/ml de tanins. En combinaison avec le TBHP, la peroxydation lipidique est diminuée à la concentration en tanins de (1, et 0,5) mg/ml.
- Enfin, les teneurs en MDA sont diminuées de manière très significative pour le pourcentage de combinaison (75% de la vitamine C/ 25% de tanins) combiné au TBHP.

Il serait intéressant de pousser cette étude en :

- Essayant de fractionner les tanins condensés et les tanins hydrolysables de la clémentine afin d'identifier la fraction qui possède l'activité anti-oxydante la plus élevée.
- Explorer l'activité anti-oxydante des poly-phénols de la clémentine *in vivo*.

Résumé :

Ce travail a pour but d'étudier l'effet protecteur *in vitro* de la vitamine C et des tanins de l'écorce de la clémentine *Citrus clémentina* en mettant en évidence l'impact de différentes concentrations des ces extraits sur le taux d'hémolyse et les paramètres de stress oxydant: MDA et GSH.

Les résultats obtenus montrent que la vitamine C en concentrations (4, 2,1) mg/ml ; et les tanins à la concentration de 0,25 mg/ml, entraînent une protection significative contre l'hémolyse. La vitamine C et l'extrait des tanins présente une activité anti-radicalaire très élevée pour la combinaison (75% vitamine C/25% tanins). Concernant les résultats des teneurs en GSH, la vitamine C non combinée au TBHP augmente les teneurs en GSH et ce quelque soit la concentration en vitamine C. Les teneurs érythrocytaire du GSH augmentent en présence de tanins non associés aux TBHP et ce pour les concentrations les plus faibles (0.125, 0.25 et 0.062) mg/ml. A l'inverse les tanins associés aux TBHP augmente les teneurs en GSH pour les concentrations les plus élevées (4, 2, 1 et 0.5) mg/ml. L'extrait de vitamine C et tanins augmentent l'activité érythrocytaire du GSH Lorsque la vitamine C est en grande proportion par apport aux tanins (75% vitamine C/ 25% tanins). Les teneurs en MDA sont diminuées en dehors d'un stress oxydant lorsque la vitamine C est associée au TBHP par apport la vitamine C non associé au TBHP pour les concentrations (4, 2, 1,0.5) mg/ml. Concernant les tanins non combinés au TBHP les teneurs en MDA sont diminuées et pour les concentrations (1, et 0,5) mg/ml. L'action synergique des tanins et de la vitamine C diminue de manière très significative la teneur plasmatique en MDA pour le pourcentage de combinaison (75% de la vitamine C/ 25% de tanins) combiné au TBHP.

Abstrat :

The purpose of this work is to study the *in vitro* protective effect of vitamin C and tannins in the bark of clementine *Citrus clementina* by highlighting the impact of different concentrations of these extracts on hemolysis rates and oxidative stress parameters: MDA and GSH. The results obtained show that vitamin C in concentrations (4, 2.1) mg/ml; and tannins at a concentration of 0.25 mg/ml, provide significant protection against hemolysis. Vitamin C and tannin extract have a very high anti-free radical activity for the combination (75% vitamin C/25% tannins). Concerning the results of GSH contents, vitamin C not combined with TBHP increases GSH contents, regardless of the vitamin C concentration. GSH erythrocyte levels increase with tannins not associated with TBHP at the lowest concentrations (0.125, 0.25 and 0.062) mg/ml. On the other hand, tannins associated with TBHP increase GSH contents for the highest concentrations (4, 2, 1 and 0.5) mg/ml. Vitamin C extract and tannins increase the erythrocyte activity of the GSH When vitamin C is in high proportion compared to tannins (75% vitamin C/ 25% tannins). MDA levels are decreased outside of oxidative stress when vitamin C is associated with TBHP by adding vitamin C not associated with TBHP for concentrations (4, 2, 1,0.5) mg/ml. For tannins not combined with TBHP the MDA contents are reduced and for concentrations (1, and 0.5) mg/ml... The synergistic action of tannins and vitamin C significantly reduces the plasma MDA content for the percentage of combination (75% of vitamin C/ 25% of tannins) combined with TBHP.

التلخيص

يهدف هذا العمل إلى دراسة التأثير الوقائي في المختبر من فيتامين C و Tanins من لحاء كليمونتين (الحمضيات كليمونينا) من خلال تسليط الضوء على تأثير التركيز المختلفة لهذه المستخلصات على معدل انحلال الدم و عوامل الإجهاد التأكسدي MDA و GSH. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن فيتامين C بتركيزات (4 ، 2.1) ملغم / مل ؛ و Tanins بتركيز 0.25 ملغم / مل ، توفير حماية كبيرة ضد انحلال الدم. يحتوي مستخلصا فيتامين C و Tanins على نشاط مضاد للغاية للراديكالية للجمع (75% فيتامين C / 25 % من Tanins. فيما يتعلق بنتائج مستويات هرمون الغدة الدرقية (GSH) ، يزيد فيتامين C غير المرتبط ب TBHP من مستويات هرمون الغدة الدرقية (GSH) وأيا كان تركيز فيتامين C. ترتفع مستويات كرات الدم الحمراء في هرمون Tanins في وجود Tanins غير المرتبطة ب TBHP ولتركيزات أقل (0.125 ، 0.25 و 0.062) ملغم / مل. على العكس من ذلك ، تزيد Tanins المرتبطة ب TBHP من مستويات هرمون GSH لأعلى التركيزات (4 و 2 و 1 و 0.5) ملغم / مل ، ويزيد مستخلص وفيتامين C من نشاط الكريات الحمر عندما يتم توفير فيتامين C إلى حد كبير من Tanins (75 % من فيتامين C / 25 % Tanins). تنخفض مستويات MDA خارج الإجهاد التأكسدي عندما يرتبط فيتامين C ب TBHP عن طريق تزويد فيتامين C غير المرتبط ب TBHP للتركيزات (4 ، 2 ، 1.0.5) ملغم / مل. فيما يتعلق ب Tanins التي لم يتم دمجها مع TBHP ، يتم تقليل محتويات MDA والتركيزات (1 و 0.5) ملغم / مل ، ويقلل العمل التآزري لـ Tanins وفيتامين C بشكل كبير من محتوى البلازما. زيادة نشاط الكريات الدم الحمراء لنسبة الجمع (75 % فيتامين C / 25 % Tanins) جنبا إلى جنب مع TBHP.

Référence bibliographique

- **Antioxidant Research Laboratory**, USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, MA 02111.
- **Bajaj Y.P.S. (1999)**. Biotechnology in agriculture and forestry 45, transgenic medicinal plants. Ed. Bajaj Y.P.S. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. 372p
- **Benediste A. et Baches M., (2002)** – Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96 p.
- **Bousbia, N. (2009)**. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique
- **Boyera N., Galey I., Bernard BA. (1998)** .Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroplast. *Int J Cosmet Sci.* Vol 20 (3), pp 151-8.
- **Bravo, L. (1998)**. Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*, 56 (11), 317-333.
- **Bruneton J., (1999)**. Pharmacognosie, Phytochimie–Plantes médicinales–3ème Ed Techniques et documentations, 227-310.
- **Chakraborty A., Ramani P., Sherlin HJ., Premkumar P., Natesan A. (2014)**. Antioxydant and pro-oxydant activity of vitamin C., in oral environnement. *Indian journal Dent Res.* Vol 25 (4), pp499-504.
- **Chambial S ., Dwivedi S ., Shukla KK ., John Pj ., Sharma P. (2013)**. vitamin c in disease prevention and cure : an overview. *Indian journal clin biochem.* Vol 28 (4) pp 314-328.
- **Corjon., (2012)**. La vitamine C en résumé. Acteur nature le nature mouvement, 2012. Disponible sur internet : URL :<http://www.acteur-nature.com/les-nutriments-naturels/la-vitamine-c-en-resume.html>.
- **Cowan, (1999)**. Plant products as antimicrobial agents. *Clinicalmicrobioloyreviews.*, 12(4): 564-570.
- **Dekkers, J. C., van Doornen, L. J. P., & Kemper, H. C. G. (1996)**. The Role of Antioxidant Vitamins and Enzymes in the Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. *Sports Medicine*, 21(3), 213–238.
- **Desaulniers M., Dubost, M., (2007)** Table de composition des aliments. Volume 1 et 2. Département de nutrition, Université de Montréal.
- **Di mascio et al, (1991)** Institut für Physiologische Chemie I, Universität Düsseldorf, FRG.
- **FAO, (2016)**. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- **Favier A., (2003)**. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, (270): 108-115

- **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., (2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes :121 – 216.
- **Flora S.J.S., Mittal M., & Mehta A., (2008).** Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4): 501.
- **FREI B., STOCKER R., ENGLAND L., AMES BN., (1990).** Ascorbate the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Med. Exp. Biol.* (264):155-163.
- **Fridovich, I. (1995).** Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97–112.
- **Frutos P., hervas GF., Giraldez and Amotécon (2004).** *Review tannins and ruminant nutrition Spanish journal of agricultural research. 2 (2): 191-202.*
- **Fuji, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., Ishi, T. (2003).** Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissue. *Asian Journal of Andrology*, 1-12
- **Fukumoto L.R., & Mazza G., (2000).** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8): 3597-3604.
- **Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M et Bovo S. 1999.** On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics*, 188 : 233-241.
- **Galvi L, Mwalogo G.J. , Winjira B.A.M., Shilds J.A. (1995).** Characterization of wattle-tannin-Bassed adhesives for Tanzania.49
- **Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh Z., Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *Mécanisme biochimique*, 91-96.
- **Gavot A, (2009).** Support des cours sur les métabolites secondaires. université de Rennes 1- L2. U2 PHR
- **Gonzalez-molina, E., Dominguez-perles, R., Moreno, D.A. ET Garcia-viguera. (2010).** Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 327-345.
- **Goudable J., Bertin-Maghit M., Dalmas E., Steghens J.P., Bouchard C., Gueugniaud P.Y., & Delafosse B., (2000).** Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive care medicine*, 26(6): 800-803.
- **Guignard, J.L. (1996).** *Biochimie végétale.* Lavoisier, paris. Pp 175-192
- **Guilland, J.G., Lequeu, B., Birlouez, I., Bouregois, G., (1998).** vitamine C. le statut vitaminique : physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique. Paris : Technique and documentation, pp. 317-340.

- **Gulçin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y. ET Aboul-Eein, d. (2010).** Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*. 3: 43-53.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., & Chapelle J.P., (2007).** Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10): 628-38
- **Haliwel, p. (1996).** anti oxydants in humain health and disease. *Anuel review of nutrition*, 16(1) ,33-50
- **Haslam, E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannin) as drugs : possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.
- **Hemingway, R.W. (1992).** Sructural variation in proanthcyanidins and their derivatives. In *Lpant polyphenols : synthesis, propieties,significan de .* Laks P.E, HemingwayR.W New York
- **Houaoura(2013)-**Production des agrumes : Comment augmenté le rendement ?
http://www.sante-viepositive.org/cadeaux_telechargeable/conseils_santé_linus_pauling.Pdf.
- **Jacquemonde C., Agostinid. et Cur K, (2009) -** Des agrumes pour l’Algérie
- **K.L. Retsky, K. Chen, J. Zeind, B. Frei (1999),** Inhibition of copperinduced LDL oxidation by Vitamin C is associated withdecreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation, *Free Rad. Biol. Med.* 26 - 90–98, pp 228.
- **Kunwar A., Mishra B., Barik A., Kumbhare L. B., Pandey R., Jain V. K., and Priyadarsini, K. I., (2007).** 3, 3’-Diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. *Chemical research in toxicology*, 20(10): 1482-1487.
- **Lemrini, W.(2006)** contribution à l’étude des paramètres cinétique de l’ascorbate oxydase de courgette verte (*cucurbita pepo medullosa*). Ebauche d’un capteur optique pour le dosage de l’acide ascorbique. Th magister en biologie. Université abou bakr belkaid Tlemcen faculté des sciences département de biologie, pp 106-109.
- **Leprince J. (2011).** Les conseils santé de linus pauling. *Santé vie positive*. Pp6. Disponible sur internet : URL :
- **Levine,SG., (1990)** Identification of unknowns by melting point and thin-layer chromatography in combination. *Journal of chemical education*. vol 75(11),pp972
- **Lillo, C., Uunis. And Peter, R. (2008).** Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31: 787-601.
- **LiuY., Heying E., and Tanumihardjo S. A, (2012).** History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11(6): 530-545.

- **Loeillet(2010)**-la production mondiale des agrumes "les marchés mondiaux"
- **Louis** Version numérisée du livre La Clémentine. Les hybrides du "citrus nobilis" par le Docteur Louis Trabut(1853-1929), publié en 1926.
- **Loussert, R. (1989)**. Les agrumes.2.paris : production Edition Lavoisier. 157 p.
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005)**. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique .Bio ed.pages 54-65.
- **Manela-Azulay M et Bagatin E. (2009)**. Cosmeceuticals vitamins. Clinics in Dermatology, 27 : 469-474.
- **Matés, J.M. (2000)**. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology, 84, 153: 83–104.
- **Meydani M, Evans WJ, Handelman G, et al.** Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. Am J Physiol. 1993;264:R992–R8.
- **Mitterand H., Albert D., & Jean D, (1971)**. Nouveau dictionnaire étymologique et historique.
- **Padayatty SJ., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee JH., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta SK., Levine M. (2003)** Vitamine C as an antioxidant :evaluation of its role in disease prevention. J Am coll Nutr.,vol 22(1),pp 18-35.
- **Peyrat-Maillard M.N., Cuvelier M.E., & Berset C., (2003)**. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. Journal of the American Oil Chemists' Society, 80(10): 1007-1012.
- **Pierangeli G., Vital G and Windell R. (2009)**. Antimicrobial activity and cytotoxicity of Chromolaena odorata (L.f). King and Robinson and Uncaria perrottetti (A.Rich) Merr. Extracts.J.Medicinal plants Res.3 (7): 511-518.
- **Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O.I. (2010)**. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedо extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. Toxicology, 278: 75-87.
- **Retsky K.L., Chen K., Zeind J., & Frei B., (1999)**. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. Free Radical Biology and Medicine, 26(1): 90-98.
- **Roberts CJ, et al. (2000)** Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. Science 287(5454):873-80
- **Roncione, R., Barbieri, M., Monzani, E., Casella, L. (2006)**. Reactive nitrogen species generated by heme proteins: Mechanism of formation and targets. Coordination Chemistry Reviews, (sous press).

- **Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K., (2003)** Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas, *J. Agric. Food Chem.* 51 :571–581
- **Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., & Sharma P., (2011).** A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 25-41.
- **Sarubin-Fragakis A., & Thomson C., (2007).** The health professional's guide to popular dietary supplements. American Dietetic Association.
- **Schagen, SK., Zampeli, VA., Makrantonaki, E., Zouboulis.,(2012)** CC. Discovering the link between nutrition and skin aging. *Dermato endocrinologie*, vol 4 (3), pp 298-307
- **Sorice A., Guerriero E., Capone F., Colonna G., Castello G., Costantini S. (2014).** Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry*. Vol 14(5), pp 444-52.
- **Stocker, R., Bowry, V. W. and Frei, B. (1991)** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88, 1646.
- **Swain, T. (1979)** : Tannins and lignins. *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites.* (éd. Par Rosenthal G.A et Jansen D.H). New York : Academic press, pp. 637-682.
- **Tomas-Barberan F.A., & Gil M.I. (Eds.), (2008).** Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products.
- **Turley SD., West CE., Horton BJ. (1976).** The role of ascorbic acid in the regulation of cholesterol metabolism and in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. Vol 24 (1-2), pp 1-18.
- **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40, pp 23
- **Virbel-Alonso C., (2011).** Citron et autres agrumes: un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé et votre beauté. Editions Eyrolles, 15.